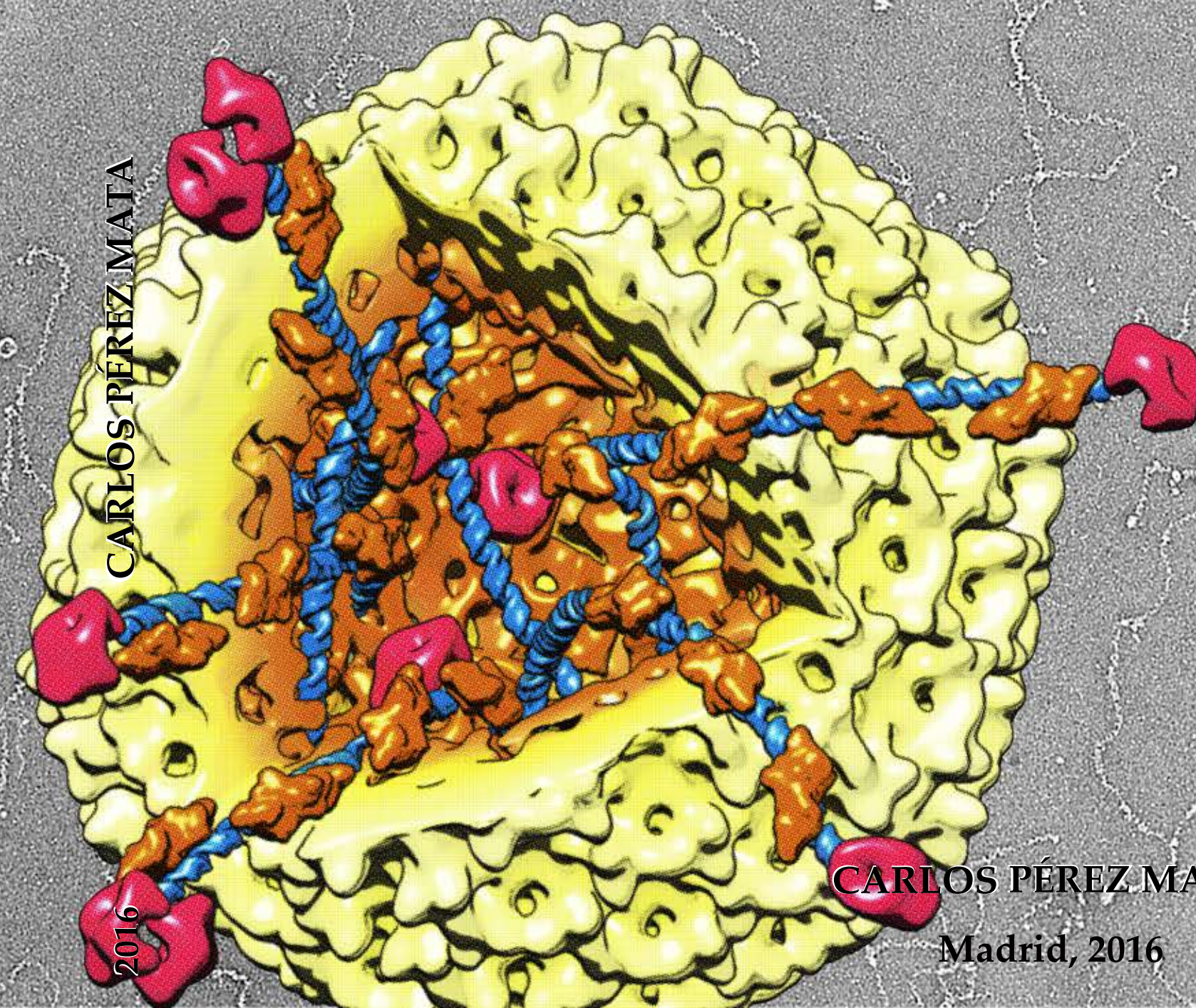


TESIS DOCTORAL

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias - Departamento de Biología Molecular

La proteína multifuncional VP3 del virus
de la bursitis infecciosa: desde su función
como proteína de andamiaje durante el
ensamblaje de la cápsida hasta la formación
de complejos ribonucleoproteicos

CARLOS PÉREZ MATA



2016

CARLOS PÉREZ MATA

Madrid, 2016



Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid

**Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias**

**La proteína multifuncional VP3 del virus de
la bursitis infecciosa: desde su función como
proteína de andamiaje durante el ensamblaje
de la cápsida hasta la formación de
complejos ribonucleoproteicos**

- TESIS DOCTORAL -

Carlos Pérez Mata

Madrid, 2016



Universidad Autónoma de Madrid



Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular Facultad de Ciencias

Memoria presentada para optar al grado de Doctor
en Biología Molecular por

Carlos Pérez Mata

Universidad Autónoma de Madrid

Noviembre de 2016

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Ruiz Castón
CNB-CSIC



CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA



El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CNB-CSIC) bajo la dirección del Dr. José Ruiz Castón. Su financiación corrió a cargo de una beca-contrato del Programa Internacional de Becas de Doctorado de la Fundación Social “La Caixa”.

AGRADECIMIENTOS

Tantos años y tanta gente que espero no olvidarme de nadie...

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director de tesis Pepe Castón por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo durante todo este tiempo y ayudar de manera continua a mi formación en el campo de la ciencia, gracias por tirar del carro y siempre darle la vuelta a mi pesimismo natural con ánimo y fuerza para hacer que este proyecto y otros más fueran posibles. Ahora más que nunca entiendo que en esta vida no hay nada fácil y que el que algo quiere, algo le cuesta. Muchas gracias también por las charlas extra-profesionales, a veces muy necesarias. Gracias a Pepe Carrascosa y José Mari Valpuesta por su implicación y su ayuda a lo largo de estos años.

Gracias a todos los que forman parte o han pasado por el laboratorio y de los que tanto he aprendido. Nerea, mi primera maestra, gracias por enseñarme tanto en tan poco tiempo y por hacerlo todo tan fácil. Elena y Mariana, gracias por estar ahí constantemente y por la ayuda continua (Elena, no se me olvida el récord de puris), así como por los momentos de bromas y discusiones no científicas que hacían todo mucho más ameno (tampoco me olvido de vuestras notas en 4D y las cintas de miles de colores). Ana, gracias por tu herencia de RNPs, por enseñarme todo lo relacionado con ellas, por tus protocolos tan detallados y por siempre estar dispuesta a responder mis preguntas por muy muy muy específicas que fueran. Josué, gracias por tu paciencia y por ayudarme en todo lo necesario con la VP1 (y también, que no se me olvida, por enseñarme a trazar miles de aminoácidos). Dani, ni con todas las palabras que pueda escribir aquí sería suficiente para agradecerte toda la paciencia y tiempo que me has brindado, todo lo que he aprendido estos años, gracias por hacer posible que me organizara en los momentos más caóticos, tu participación y consejos con las procápsidas, por transmitirme ánimo y fuerza constantemente y por las charlas de crossfit muy necesarias para desconectar (a ver si un día entrenamos juntos). Álvaro, gracias por responder mis preguntas sobre todo lo relacionado con AFM. Carol, gracias por tu optimismo y tus continuos mensajes y notas de apoyo, eres genial tanto personal como profesionalmente, estoy muy orgulloso de que seas mi padawan (aunque suene un poco friki). Carmen, gracias por ser siempre tan atenta y amable. Esther, gracias por tu gran ayuda en tan poco tiempo y por ser una gran trabajadora. Asimismo quiero dar las gracias a todos los patitos que han pasado por aquí a lo largo de los años: Gonzalo, Maru, David, Álex y Rodrigo. Diego, por tu ayuda continua, tu paciencia para responder todas (y cuando digo todas, son todas) mis preguntas, por tus consejos y tu profesionalidad, así como por las charlas no científicas, gracias amigo. Gracias a Paco Rodríguez por sus consejos iniciales.

Quiero mostrar mis agradecimientos a todas las personas que de forma directa o indirecta han estado implicadas en este proyecto. Johann, gracias por tu profesionalidad y por aportar siempre positivamente con tu experiencia en los análisis de AFM. Javier, gracias por tus consejos y por responder a todas mis dudas sobre protocolos por absurdas y obvias que fueran. Jaime, gracias por tu implicación en los análisis estructurales de las RNPs, así como por tus charlas, consejos y por siempre estar ahí para escuchar y dar apoyo. Juan Fontana, gracias sinceras por todo lo que aprendí profesionalmente contigo y por una acogida tan familiar que hizo toda la estancia en USA mucho más sencilla. *Alasdair Steven, thank you for giving me the opportunity to be part of your team, it was a very good experience to work in your lab. Also, I'd like to thank all the rest of the people there, especially to Dennis y his continuous support with the microscopes.* Gracias al personal de los distintos servicios del Centro Nacional de Biotecnología que han permitido la realización de este trabajo.

Por otro lado, gracias a mi primer grupo de las comidas y por permitir la desconexión de la ciencia aunque fuera un rato: Nere, Idoia, Mariana, Ana, Susana de Lucas, Susana Guerra, Laura y Marta. Gracias a todos los compañeros de los laboratorios S0 y S1 que ya no están: Desi, Marina, Sara, María, Elías, Mar, Vero, Michelle, Ana Beloso, Srdja, José, Borja; y los que están por aquí: Rocío, Encarna, MariJose, Javi Chichón, Marcos, Bego, Mar, Rebe, Ana, Javi, Lisette, Lucía (gracias por esos descansos), Jorge, Tere, Virginia, Eva, José Jesús y Charo. Gracias a todos los que estáis en mi nuevo grupo de las comidas y sobre todo a las sobremesas y sus temas tan políticamente correctos que abarcan distintos ámbitos del conocimiento desde puntos de vista de lo más profundos y relevantes (es broma, el 95% del tiempo sólo se habla de obscenidades).

Por último gracias a mis amigos, en especial a Cristian por siempre estar ahí para ayudar a desahogarme; y a mi familia, en especial a mis padres por haber sabido aguantarme durante tantos años y haberme permitido llegar hasta aquí.

“Militia est vita hominis super terram, et sicut dies mercenarii dies ejus”. (Job VII: 1).

ABREVIATURAS

2D:	bidimensional	IBDV:	virus de la bursitis infecciosa
3D:	tridimensional	IPNV:	virus de la necrosis pancreática
3DR:	reconstrucción tridimensional		infecciosa
α-XX:	anticuerpo anti-XX	IPTG:	isopentenil tio- β -galactósido
aa:	aminoácido	kb:	kilobase
AFM:	microscopía de fuerzas	kDa:	kilodalton
	atómicas	ME:	microscopía electrónica
ATCC:	colección americana de	MOI:	multiplicidad de infección
	tipos celulares	mRNA:	ácido ribonucleico mensajero
ATP:	adenosina-5'-trifosfato	MVM:	virus diminuto del ratón
BrEt:	bromuro de etidio	MW:	peso molecular
BSA:	seroalbúmina bovina	NMR:	resonancia magnética nuclear
BSC-40:	células epiteliales renales de <i>Cercopithecus</i>	N-terminal:	amino terminal
	<i>aethiops</i>	ORF:	fase abierta de lectura
BSNV:	virus del pez de la cabeza de serpiente	pb:	par de bases
BTv:	virus de la lengua azul	PBS:	tampón fosfato salino
CCD:	dispositivo de cargas interconectadas	PBV:	pico birnavirus
CPV:	virus de la poliedrosis citoplasmática	PcV:	virus de <i>Penicillium chrysogenum</i>
crioME:	criomicroscopía electrónica	PDB:	base de datos de proteínas
crioTE:	criotomografía electrónica		(<i>Protein Data Bank</i>)
CsCl:	cloruro de cesio	PEG:	polietilenglicol
C-terminal:	carboxilo terminal	pfu:	unidad formadora de placa
CTF:	función de transferencia de contraste	PIPES:	piperazina-N,N-bis
CTP:	citidina-5'-trifosfato		(ácido 2-etanosulfónico)
DNA:	ácido desoxiribonucleico	PKR:	quinasa dependiente de dsRNA
DNasa:	desoxiribonucleasa	PMSF:	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
dsDNA:	ácido desoxiribonucleico de cadena doble	PsV-F:	partitivirus F de <i>Penicillium</i>
dsRNA:	ácido ribonucleico de cadena doble		<i>stoloniferum</i>
DMEM:	medio de Eagle modificado por Dulbecco	PurSA:	aminopeptidasa sensible
dNTP:	desoxinucleótido trifosfato		a puromicina
DTT :	ditiotreitól	QM7:	fibroblastos musculares de
DXV:	virus X de Drosophila		<i>Coturnix japonica</i>
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético	RdRp:	RNA polimerasa RNA
EGTA:	ácido etilenglicoltetraacético		dependiente
EMSA:	ensayos de retardo de movilidad	RDV:	virus enano del arroz
	electroforética	RNA:	ácido ribonucleico
ESV:	virus Espíritu Santo	RNAi:	RNA de interferencia
FCS:	suero fetal de ternero	RNasa:	ribonucleasa
FSC:	Fourier Shell Correlation	RNPs:	complejos
GCRV:	aquareovirus de la carpa hervibora		ribonucleoproteicos
GTP:	guanosina-5'-trifosfato	rBV:	baculovirus recombinante
H5:	células <i>HighFive</i>	rVV:	virus vaccinia recombinante
HOPG:	superficie pirolítica de grafito	SDS:	dodecil sulfato sódico
HT:	cola de histidinas (<i>Histidine Tag</i>)	hpi.:	horas postinfección

SDS-PAGE:	electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	T:	número de triangulación
ssDNA:	DNA de cadena simple	TBE:	tampón Tris-Borato-EDTA
ssRNA:	RNA de cadena simple	Tris:	tri-(hidroximetil)-aminometano
(+) ssRNA	RNA de cadena simple y polaridad positiva	TV-1:	virus Tellina tipo I
(-) ssRNA:	RNA de cadena simple y polaridad negativa	UTP:	uridina-5'-trifosfato
SV-40:	virus del simio 40	UTR:	región no traducida
SVP:	partícula subviral	VLP:	pseudopartícula viral
		WB:	inmunodetección de proteínas en membrana (<i>Western blot</i>)
		YAV:	virus de la ascitis de cola amarilla

CÓDIGOS DE UNA Y TRES LETRAS PARA LOS AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido Glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V

ÍNDICE

ABSTRACT	1
1. Introducción	3
1.1 Estructura y función de la cápsida viral	5
1.2 Ensamblaje de la cápsida viral	7
1.2.1 Proteínas de andamiaje en el ensamblaje viral	8
1.2.2 Factores del huésped implicados en el ensamblaje de la cápsida: chaperonas	9
1.2.3 Maduración de la cápsida: proteasas	9
1.3 El virus de la bursitis infecciosa	10
1.3.1 Organización genómica de IBDV	11
1.3.2 Componentes estructurales de IBDV	12
1.3.3 La proteína multifuncional VP3	16
1.3.4 Polimorfismo estructural de la proteína de la cápsida de IBDV	17
1.4 Relaciones estructurales y funcionales de IBDV con los virus ssRNA y dsRNA	20
2. Objetivos	25
3. Materiales y Métodos	27
3.1 Material biológico	31
3.1.1 Células eucariotas	31
3.1.2 Virus	31
3.1.3 Anticuerpos	31
3.3 Infecciones y expresión de proteínas	32
3.3.1 Infección con rBVs	32
3.3.2 Infección con rVVs	32
3.3.3 Infección con IBDV	32
3.3.4 Titulación de stocks de rVVs e IBDV	32
3.3.5 Transfección con RNPs y VPg-dsRNA	33
3.4 Purificación de proteínas y ensamblados virales	33
3.4.1 Purificación de VLPs derivadas de la expresión de rVV vT7/LacOI/Poly	33
3.4.2 Purificación de viriones de IBDV	34
3.4.3 Purificación de los complejos ribonucleoproteicos (RNPs) de IBDV	34
3.4.4 Purificación del complejo VPg-dsRNA en condiciones nativas	35
3.4.5 Purificación de dsRNA de IBDV	35
3.4.6 Purificación de las proteínas HT-VP1 y HT-VP3	36
3.5 Análisis bioquímico	36
3.5.1 Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	36

3.5.2	Análisis electroforético en geles nativos de agarosa	37
3.5.3	Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de agarosa	37
3.5.4	Electrotransferencia e inmunodetección (Western blot)	37
3.5.5	Determinación de la concentración de proteína	37
3.5.6	Determinación de la concentración de RNA	38
3.5.7	Ensayo de actividad RNA polimerasa de IBDV	38
3.6	Microscopía de fuerzas atómicas	39
3.7	Microscopía electrónica	40
3.7.1	Contrastado de las muestras	40
3.7.1.1	Tinción negativa	40
3.7.1.2	Inmunomarcaje	40
3.7.2	Criomicroscopía electrónica	40
3.7.3	Criotomografía electrónica	41
3.7.4	Procesamiento digital de especímenes sin simetría	41
3.7.5	Procesamiento digital de especímenes con simetría helicoidal	44
3.7.6	Procesamiento digital de especímenes con simetría icosaédrica	44
3.7.7	Procesamiento digital de series de inclinación y promediado subtomográfico	46
4.	Resultados	47
4.1	Análisis de las poblaciones de IBDV	49
4.1.1	Caracterización bioquímica de las poblaciones de IBDV	49
4.1.2	Criotomografía electrónica de las poblaciones virales de IBDV	49
4.1.3	Caracterización bioquímica y por microscopía electrónica de la población E1	52
4.1.4	Criomicroscopía tridimensional de cápsidas T=13 de la población E1	55
4.2	Análisis de la funcionalidad de las RNPs de IBDV	59
4.2.1	Obtención y purificación del complejo VPg-dsRNA en condiciones nativas	59
4.2.2	Caracterización bioquímica y funcional del complejo VPg-dsRNA	60
4.2.3	Caracterización de la infectividad de las RNPs nativas y reconstituidas	63
4.3	Análisis estructural de RNPs de IBDV	65
4.3.1	Caracterización estructural de RNPs de IBDV por microscopía electrónica y tinción negativa	65
4.3.2	Caracterización estructural de RNPs de IBDV por criomicroscopía electrónica	67
4.3.3	Caracterización estructural de extremos de RNPs por microscopía electrónica	67
4.3.4	Microscopía electrónica tridimensional de VP1	69
4.3.5	Microscopía electrónica tridimensional de extremos de RNPs de IBDV	71
4.4	Análisis de IBDV mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM)	73
4.4.1	Propiedades mecánicas de las poblaciones de IBDV	73
4.4.2	Caracterización bioquímica y por microscopía electrónica de VLPs de IBDV	73

4.4.3	Propiedades mecánicas de VLPs de IBDV	75
4.4.4	Análisis de las poblaciones de IBDV por fatiga mecánica	75
4.4.5	Ensamblaje reversible de RNPs de IBDV en dímeros y estructuras complejas	77
5.	Discusión	81
5.1	VP3 como proteína de andamiaje durante el ensamblaje de la cápsida de IBDV	84
5.2	Estabilidad mecánica de la cápsida de IBDV mediada por RNPs	87
5.3	Análisis de VP3 y VP1 como componentes esenciales de las RNPs de IBDV	91
6.	Conclusiones	95
7.	Bibliografía	99
8.	Publicaciones	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Estrategias para el ensamblaje de cápsidas virales	8
Figura 2. Organización genómica de IBDV	11
Figura 3. Estructura de la cápsida de IBDV	13
Figura 4. Estructura de VP2	14
Figura 5. Mapa tridimensional de los filamentos helicoidales de VP4 de IBDV	15
Figura 6. Estructura de VP3	17
Figura 7. Estructuras derivadas de la expresión de formas de pVP2 con extremos carboxilo terminal de distinta longitud	19
Figura 8. Modelo para el ensamblaje de IBDV	20
Figura 9. Estructura de virus dsRNA	23
Figura 10. Protocolo de reconstrucción tridimensional a partir de partículas individuales	43
Figura 11. Análisis bioquímico de los componentes estructurales de las poblaciones de IBDV	50
Figura 12. CrioTE de las poblaciones de IBDV	50
Figura 13. Análisis del contenido genómico de las poblaciones de IBDV por crioTE	51
Figura 14. Subtomogramas promediados y 3DRs de las poblaciones de IBDV	53
Figura 15. Análisis de las cápsidas de la población E1 de IBDV	54
Figura 16. CrioME y 3DRs de cápsidas T=13 de la población E1 de IBDV	56
Figura 17. Resolución de las 3DRs de las cápsidas T=13 de la población E1 de IBDV	56
Figura 18. Análisis estructural comparativo de cápsidas T=13 de la población E1 de IBDV	58
Figura 19. Análisis de las conexiones entre pVP2/VP2 y VP3	59
Figura 20. Determinación de las condiciones óptimas para la purificación de complejos nativos de VPg-dsRNA	61
Figura 21. Reconstitución de VPg-dsRNA con HT-VP3	62
Figura 22. Caracterización funcional de RNPs reconstituidas	63
Figura 23. Análisis de la infectividad de las RNPs y los complejos VPg-dsRNA	64

Figura 24. Análisis estructural de RNPs de IBDV	66
Figura 25. Caracterización de RNPs de IBDV por inmunomarcaje	66
Figura 26. Análisis estructural por crioME de RNPs de IBDV	68
Figura 27. Caracterización estructural de los extremos de RNPs de IBDV	69
Figura 28. Análisis estructural de VP1 mediante ME y tinción negativa	70
Figura 29. Caracterización estructural de los extremos de RNPs de IBDV con una molécula de VP1/VPg	72
Figura 30. Caracterización estructural de los extremos de RNPs con dos moléculas de VP1/VPg	73
Figura 31. Rigidez mecánica de las poblaciones de IBDV	74
Figura 32. Análisis bioquímico y por ME de VLPs derivadas de la expresión de rVV VT7/LacOI/Poly	75
Figura 33. Rigidez mecánica de VLPs de IBDV y comparación con las poblaciones de IBDV	76
Figura 34. Ruptura de las partículas de las poblaciones de IBDV por fatiga mecánica	78
Figura 35. Análisis de la formación reversible de agregados de RNPs en presencia de cationes divalentes	79
Figura 36. Modelo para el ensamblaje de la cápsida T=13 de IBDV a través de la formación de una procápsida	86
Figura 37. Ruta de ensamblaje de la cápsida de herpesvirus	88
Figura 38. Dímeros de RNPs como unidad básica de estabilización de la cápsida de IBDV	89

ABSTRACT

Infectious bursal disease virus (IBDV), an avian double-stranded (ds)RNA virus of the Birnaviridae family, encompasses features of positive and negative ssRNA viruses. IBDV has a polypliod, bisegmented dsRNA genome, organized as ribonucleoprotein particles (RNP), enclosed within a single, non-enveloped ~70-nm-diameter capsid with a T=13/ lattice. The capsid structural units are trimers of a single protein, VP2. The VP2 precursor (pVP2) is encoded as part of the polyprotein NH₂-pVP2-VP4-VP3-COOH; VP4 is the viral protease, able to cleave its own N and C termini. VP3 is a multifunctional protein that, in addition to its RNA-binding activity, interacts with itself, with pVP2, or with VP1 (the viral polymerase). Indirect analyses suggested that VP3 acts as a scaffolding protein during capsid morphogenesis, recruits VP1, and also encapsidates the viral genome. VP1 is found as a free protein or is covalently linked to the 5' ends of the two genome segments (the so-called VPg).

In IBDV-infected cells, the assembly pathway gives rise mainly to virions that package four RNP, although minor discrete viral populations with lower RNP content are also formed. We analyzed these IBDV populations (E1-E6, ranging from none to four RNP). Atomic force microscopy (AFM) analysis of E1 empty T=13 particles, in combination with cryo-electron tomography (cryo-ET) and three-dimensional single-particle cryo-electron microscopy (3D cryo-EM) showed that VP3 is organized as a second, partially organized protein layer beneath the T=13 layer of (p)VP2. This is the first observation in which VP3 is caught acting as a scaffold protein in these procapsid-like particles. Interactions between VP2/pVP2 and VP3 were located mainly on hexameric positions of the T=13 capsid.

IBDV virions dialyzed against a low ionic strength basic buffer rendered structurally preserved RNP (comprised of dsRNA, VP3 and VP1/VPg), which were functionally competent for capsid-independent RNA synthesis, and also effectively propagated the virus in transfection experiments. We purified VPg-dsRNA complexes in non-denaturing conditions. Titration of VPg-dsRNA with VP3 (monitored in electrophoretic mobility shift assays) allowed us to determine the VP3 ratio at which RNP properties are restored. Negative stain EM and cryo-EM analysis indicated that RNP are dsRNA molecules wrapped with VP3 monomers. Hybrid methods (EM combined with high-resolution X-ray structures) were used to analyze the RNP ends, in which one or two copies of VP1/VPg were found.

Finally, we analyzed the mechanical properties of the IBDV populations. The IBDV population with the largest RNP number (and best fitness) showed greatest capsid rigidity. When bound to dsRNA, VP3 reinforces virus stiffness. These contacts involve interactions with capsid structural subunits that differ from the initial interactions during capsid assembly. Our analysis suggest that RNP dimers are the basic stabilization units of the virion, which provides better understanding of multifunctional proteins and highlights the duality of RNP as capsid-stabilizing and genetic information platforms.

1. Introducción

Los virus suponen el mayor exponente en cuanto a economía de la información se refiere, lo que se ve reflejado no sólo en su estrategia de multiplicación y diseminación, sino también en su construcción. Es interesante cómo los virus llevan a cabo las complejas funciones de su ciclo vital considerando la limitada información contenida en su genoma. En su forma más simple, un virus está formado por el ácido nucleico y un contenedor proteico, la cápsida, que lo protege del ambiente exterior durante su fase extracelular. Las partículas virales varían enormemente en tamaño y forma, así como también en el número y naturaleza de las macromoléculas de las que se componen. Sin embargo, siguen principios generales idénticos y funciones similares (Castón, 2013; Harrison, 2007; Mateu, 2013).

1.1 Estructura y función de la cápsida viral

La función primaria de la cápsida viral es la de proteger el genoma frente a agentes físicos y químicos del entorno. Además, la cápsida participa activamente en numerosos procesos a lo largo del ciclo viral: selecciona el ácido nucleico viral en el entorno celular, busca su salida, protege el genoma viral durante su transporte de un hospedador a otro, reconoce la siguiente célula huésped, se internaliza en ella y, finalmente, libera el ácido nucleico para su replicación (Flint *et al.*, 2009; Mateo, 2004). Algunas cápsidas también participan activamente en la replicación del genoma viral. Todas estas funciones son compaginadas con elevadas tasas de mutación para evitar el sistema inmune en vertebrados. Por tanto, la consideración de las cápsidas como estructuras cerradas inertes, meros contenedores del material genético, no es adecuada ya que experimentan profundas modificaciones estrechamente relacionadas con el momento del ciclo vital del virus (Baker *et al.*, 1999; Prasad y Schmid, 2012). La cápsida debe ser considerada como una estructura metaestable, que representa el compromiso entre la estabilidad necesaria para que los virus sobrevivan en el medio extracelular, y la inestabilidad para convertirse en estructuras lábiles capaces de liberar el genoma en el interior de la célula huésped tras la interacción con receptores celulares específicos (Chow *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1998; Rossmann *et al.*, 1997). Los virus han desarrollado soluciones estructurales únicas frente a las numerosas presiones selectivas impuestas por las diversas funciones que sus cápsidas deben desarrollar a lo largo del ciclo viral (Chow *et al.*, 1997; Johnson, 1996; Rossmann *et al.*, 1997).

Debido a la limitada capacidad codificante impuesta por el tamaño de su genoma, el ensamblaje eficiente de una partícula viral radica en dos aspectos básicos, la aplicación de elementos de simetría y el polimorfismo de las proteínas estructurales (Cardone *et al.*, 2009; Dokland, 2000; Gertsman *et al.*, 2009; Steven *et al.*, 2005). El uso de relaciones de simetría permite generar estructuras tridimensionales de forma y tamaño definidos a partir de un número de copias de

uno o pocos componentes proteicos. Las subunidades proteicas que forman las cápsidas interactúan entre sí mediante enlaces no covalentes débiles, con la excepción del bacteriófago HK97 donde las subunidades estructurales forman enlaces covalentes (Hendrix y Johnson, 2012; Popa *et al.*, 1991). La estabilidad de la partícula viral se consigue por la cooperación de múltiples interacciones de tipo iónico, hidrofóbico, enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals, que se establecen cuando las subunidades proteicas adquieren posiciones determinadas por relaciones de simetría. Estas interacciones débiles son de enorme trascendencia ya que permiten una cierta flexibilidad en los contactos intersubunidades (contactos equivalentes pero no idénticos), lo que implica ligeras variaciones en la estructura tridimensional (3D) de las subunidades proteicas.

Excepto en los virus complejos, de las numerosas formas y tamaños entre las diferentes familias virales, las simetrías icosaédrica y helicoidal son las más frecuentes entre las cápsidas virales (Cann, 2012; Flint *et al.*, 2009). La simetría helicoidal simplifica el ensamblaje de la cápsida y es flexible en cuanto al empaquetamiento del genoma. Las subunidades que conforman la cápsida helicoidal se disponen en hexámeros planos, que proporcionan entornos idénticos con excepción de los extremos, y con un determinado ángulo de curvatura impuesto por las interacciones entre las subunidades que determina el diámetro del tubo. Sin embargo está relativamente limitada ya que menos del 10% de las familias virales tienen simetría helicoidal, siendo la mayoría virus de plantas y bacteriófagos (Abrescia *et al.*, 2012; Baker *et al.*, 1999; Bamford *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2003).

El icosaedro es una partícula cerrada con simetría cúbica que permite posicionar el mayor número de subunidades asimétricas en su superficie manteniendo interacciones idénticas y, por tanto, representa la estructura regular más estable y económica desde el punto de vista genético. Además, esta estructura presenta la relación superficie/volumen más baja, siendo por tanto el poliedro con la mayor capacidad de almacenamiento por unidad de información genética. Los virus icosaédricos pueden ser descritos mediante la teoría de la cuasi-equivalencia y el concepto del número de triangulación T (Caspar y Klug, 1962). Los virus icosaédricos más simples están formados por 60 subunidades idénticas formando exclusivamente pentámeros (cápsidas T=1). Para la formación de cápsidas con más de 60 subunidades, es necesario que éstas se ensamblen formando pentámeros y hexámeros por lo que no pueden tener interacciones idénticas (polimorfismo conformacional) sino cuasi-equivalentes (cápsidas con T>1).

La teoría de la cuasi-equivalencia implica pequeñas diferencias en las interacciones o conformaciones de las subunidades aunque en términos prácticos, los virus muestran excepciones respecto a este principio y se han descrito cápsidas equivalentes, cuasi-equivalentes

y no equivalentes. El control de los diferentes estados conformacionales está modulado por diferentes factores denominados interruptores moleculares (del inglés *molecular switches*) que pueden ser segmentos peptídicos intrínsecos, regiones de RNA, iones metálicos, variaciones de pH, o distintas combinaciones de éstos (Johnson, 1996; Johnson, 2008). Estos interruptores moleculares pueden resultar insuficientes en la formación de cápsidas complejas, y se requiere la participación de factores morfogenéticos auxiliares específicos del virus como proteínas de andamiaje (*scaffolding proteins*) y proteínas accesorias y/o proteolíticas así como el propio ácido nucleico y/o elementos de la maquinaria celular del huésped (Dokland, 2000; Irigoyen *et al.*, 2012; Mateu, 2013; Morais *et al.*, 2004). A pesar de la gran flexibilidad y posibilidades que ofrecen las cápsidas icosaédricas cuasi-equivalentes, en numerosas ocasiones se necesita la presencia de más de una proteína estructural. En estos virus no se puede hablar de cuasi-equivalencia en sentido estricto, ya que las posiciones cuasi-equivalentes están ocupadas por distintas proteínas, y se refieren como pseudo-números (P) de triangulación (como P=3 en los picornavirus).

1.2 Ensamblaje de la cápsida viral

La cápsida de virus sencillos (por ejemplo, con simetría helicoidal o T=1) puede ensamblarse espontáneamente bajo condiciones adecuadas a partir de numerosas copias de la proteína estructural. En este caso, las pautas para el ensamblaje están contenidas en la estructura terciaria de la subunidad. Sin embargo, la formación de una partícula viral compleja suele implicar intermediarios de ensamblaje transitorios en los que las proteínas de andamiaje y/o el ácido nucleico interaccionan con las subunidades de la cápsida para promover y dirigir eficientemente el proceso de oligomerización (Figura 1). Además, muchas cápsidas experimentan un proceso de maduración que implica modificaciones covalentes y/o cambios conformacionales que incrementan la estabilidad de la partícula (Mateu, 2013).

Las unidades de ensamblaje de las cápsidas varían desde los monómeros de la proteína de la cápsida a oligómeros como dímeros, trímeros, pentámeros o hexámeros. La estrategia más simple implica el autoensamblaje de las unidades de ensamblaje, pero en algunos casos se requiere un paso previo de activación de las mismas. Existen dos estrategias de empaquetamiento de los genomas virales, bien mediante un proceso realizado por un motor molecular con gasto de ATP asociado a una procápsida ensamblada (Johnson y Chiu, 2007; Speir y Johnson, 2012; Sun *et al.*, 2010), o bien en un proceso que ocurre al mismo tiempo que el ensamblaje de la cápsida (Johnson y Rueckert, 1997).

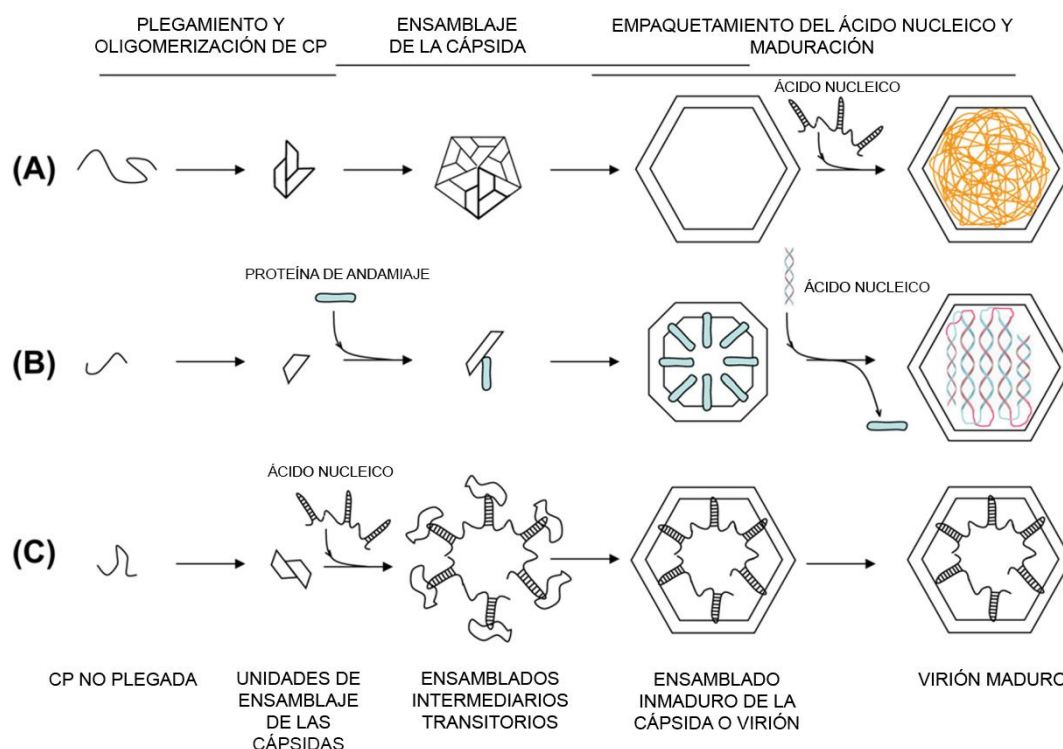


Figura 1. Estrategias para el ensamblaje de cápsidas virales. (A) Autoensamblaje de las subunidades estructurales de la cápsida. (B) Ensamblaje mediado por proteínas de andamiaje. (C) Ensamblaje mediado por unión al ácido nucleico (adaptado de Mateu, 2013).

1.2.1 Proteínas de andamiaje en el ensamblaje viral

Muchos bacteriófagos DNA de cadena doble (dsDNA) y herpesvirus llevan a cabo la formación de una procápsida y posteriormente empaquetan el DNA en su interior. La procápsida se ensambla gracias a la interacción específica (pero transitoria) entre la proteína estructural de la cápsida y la proteína de andamiaje (Black y Rao, 2012; Cardone *et al.*, 2012). Una vez que se ha formado la procápsida, las copias internas de la proteína de andamiaje son eliminadas antes o durante el empaquetamiento del DNA, mediante proteólisis como en T4 y λ , liberadas y recicladas como en P22, T7 y ϕ 29, o una combinación de éstos como en herpesvirus. En los fagos ϕ X174 y P4, y también en herpesvirus, las proteínas de andamiaje se ensamblan sobre el exterior de la cápsida (Aksyuk *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2008; Uchiyama *et al.*, 2009). Otra variante es la descrita en el fago HK97, donde un dominio de la propia proteína de la cápsida (denominado dominio Δ) actúa como proteína de andamiaje interna y, una vez que la procápsida se ha formado, este dominio es eliminado proteolíticamente (Duda *et al.*, 2013).

Las proteínas de andamiaje tienen un alto contenido en hélices α (Steven *et al.*, 2005) y funcionan como iniciadoras del ensamblaje de la cápsida por nucleación, promoviendo el ensamblaje mediante el aumento de la concentración efectiva de protómeros, y/o disminuyendo

la barrera energética de la transición conformacional de la proteína de la cápsida de un estado de ensamblaje incompetente a competente. Además de dirigir el ensamblaje hacia una estructura cuaternaria correcta pueden mediar la incorporación de otras proteínas virales a la cápsida.

1.2.2 Factores del huésped implicados en el ensamblaje de la cápsida: chaperonas

Las chaperonas están presentes en todas las células y su principal función es ayudar en el plegamiento, ensamblaje y/o transporte de otras proteínas (Leidig *et al.*, 2013; Nicoll *et al.*, 2006). En infecciones virales previenen asociaciones incorrectas y no específicas durante la síntesis de proteínas (Flint *et al.*, 2009), un proceso frecuente en el citoplasma del huésped. La primera chaperona descrita fue el producto del gen *groEL* de *E. coli*, indispensable para la replicación de los bacteriófagos T4 y λ ya que interviene en el correcto plegamiento de la proteína de la cápsida (Ang *et al.*, 2000). Muchos virus codifican para sus propias chaperonas, como la proteína L4 de adenovirus, que facilita el plegamiento de las subunidades monoméricas que conforman el hexón o su ensamblaje en trímeros (San Martín, 2012).

1.2.3 Maduración de la cápsida: proteasas

Muchas partículas virales son ensambladas en una forma precursora no infecciosa (denominada provirión, precabeza o procápsida) y requieren de un proceso de maduración para convertirse en una partícula infectiva más estable. Este proceso se ha descrito prácticamente en todos los bacteriófagos y virus animales (Veesler y Johnson, 2012). La maduración es un proceso irreversible y suele estar controlada por proteasas cuya acción desencadena importantes cambios conformacionales así como la eliminación de ciertos componentes. Los péptidos liberados suelen ser péptidos de fusión y/o con actividad lítica, por lo que este proceso suele ocurrir en el medio extracelular (Steven *et al.*, 2005). En virus con envuelta el proceso de maduración se centra en modificaciones post-traduccionales de las glicoproteínas que reconocen a sus receptores, mediante la adicción de carbohidratos, lípidos, grupos acetilo, sulfato o fosfato. En algunos virus la maduración implica la formación de enlaces covalentes y/o la adición de proteínas que actúan como “cemento”. La proteasa viral de los herpesvirus se localiza en la procápsida como una proteína de fusión con la proteína de andamiaje; elimina un péptido terminal de la proteína de andamiaje y queda así separada de la cápsida (Cardone *et al.*, 2012). Las proteasas pueden ser de origen viral como en T4, herpesvirus, adenovirus y picornavirus (Schmidt y Darke, 1997; Tuthill *et al.*, 2010), del huésped como en el virus de la gripe (Bottcher-Friebertshauser *et al.*, 2010), o la propia proteína de la cápsida como en nodavirus y tetravirus, (Munshi *et al.*, 1996; Schneemann *et al.*, 1992).

1.3 El virus de la bursitis infecciosa

El virus de la bursitis infecciosa (IBDV) pertenece a la familia *Birnaviridae* que agrupa virus RNA de cadena doble (dsRNA) (Dobos *et al.*, 1979) capaces de infectar una gran variedad de especies animales que incluyen vertebrados, moluscos, insectos y rotíferos. Los birnavirus se agrupan en cuatro géneros (Delmas *et al.*, 2012):

- *Avibirnavirus*, que infectan aves y su miembro más representativo es IBDV (Nick *et al.*, 1976).
- *Aquabirnavirus*, que infectan peces, moluscos y crustáceos. Entre sus miembros se incluye el virus de la necrosis pancreática infecciosa (IPNV; Cohen *et al.*, 1973) que infecta salmones y truchas, el virus de la ascitis de cola amarilla (YAV; Sato *et al.*, 1999) que infecta peces de la especie *Seriola quinqueradiata* y el virus Tellina-1 (TV-1; Underwood *et al.*, 1977) que infecta moluscos.
- *Entomobirnavirus*, que infectan insectos y su principal representante es el virus X de *Drosophila* (DXV; Dobos *et al.*, 1979), así como el virus Espíritu Santo (ESV; Vancini *et al.*, 2012).
- *Blosnavirus* cuyo único representante es el virus del pez de la cabeza de serpiente (*Channa maculata*) (BSNV; Da Costa *et al.*, 2003).

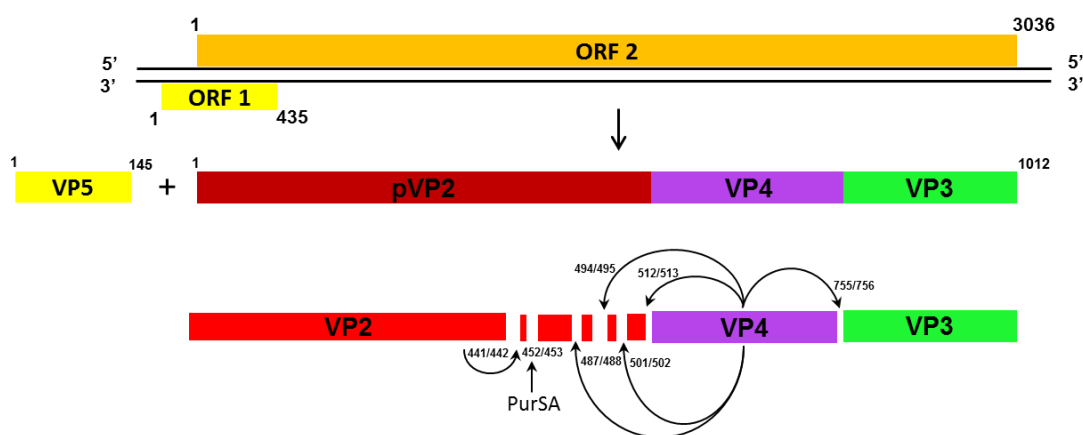
IBDV es el agente causal de la bursitis infecciosa o enfermedad de Gumboro, descrita formalmente en 1962 (Cosgrove, 1962). Esta enfermedad afecta fundamentalmente a pollos jóvenes (*Gallus gallus*), provocando la destrucción de células linfoides en la bolsa de Fabricio, órgano linfóide donde se produce la maduración de linfocitos B y solo presente en aves (Kaufer y Weiss, 1980). La infección es transmitida por vía oral, principalmente entre individuos de 3 a 6 semanas de edad, y es muy resistente a los métodos tradicionales de desinfección como la inactivación química o por calor, por lo que actualmente los programas de vacunación intensiva son los únicos métodos de control eficiente (Negash *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista de la industria avícola, esta enfermedad supone un alto impacto económico ya que produce un síndrome de inmunosupresión en los individuos afectados, que incrementa su susceptibilidad a infecciones por otros agentes patógenos; además de verse comprometida la capacidad de respuesta frente a la vacunación contra otros agentes infecciosos (Muller *et al.*, 2003). Las modificaciones en la secuencia de la proteína de la cápsida y de la polimerasa viral determinan la virulencia de la cepa infectiva (Escaffre *et al.*, 2013); provocando índices de mortalidad de hasta un 100% en cepas que afectan a individuos jóvenes, así como la disminución considerable en la cantidad y calidad de huevos y carne en el caso de cepas que afectan a individuos adultos (Kaufer y Weiss, 1980).

1.3.1 Organización genómica de IBDV

El genoma de IBDV está organizado en dos segmentos de dsRNA, el segmento A, de 3.2 kb, y el segmento B, de 2.8 kb, flanqueados por regiones no codificantes (UTRs) en ambos extremos (Muller y Nitschke, 1987; Muller *et al.*, 1979) (Figura 2). IBDV es un virus poliploide que encapsida hasta cuatro segmentos de genoma siendo más infectivas las partículas que contienen un mayor número de segmentos (Luque *et al.*, 2009a). La poliploidía es una característica de los birnavirus (Lago *et al.*, 2016). El dsRNA en el interior de la cápsida se encuentra formando complejos ribonucleoproteicos (RNPs) con la proteína VP3 a lo largo del segmento, y con la RNA-polimerasa RNA dependiente (RdRp) **VP1**, que se encuentra soluble y unida al extremo 5' de ambos segmentos (denominada VPg) (Hjalmarsson *et al.*, 1999; Luque *et al.*, 2009b).

Segmento A (3.2kb)



Segmento B (2.8kb)

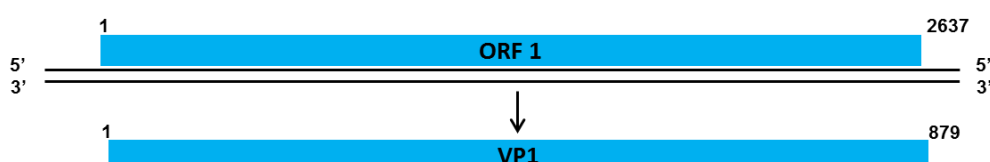


Figura 2. Organización genómica de IBDV. El segmento A contiene dos ORFs, que codifican la proteína VP5 y la poliproteína viral. La poliproteína es procesada cotraduccionalmente por la proteasa viral VP4 dando lugar a las proteínas pVP2, VP4 y VP3. El extremo carboxilo terminal de pVP2 es procesado en las posiciones indicadas por diferentes factores virales y celulares. El segmento B contiene una única ORF que codifica la RdRp del virus, VP1, que cataliza la transcripción y la replicación del genoma.

El **segmento A** contiene dos fases abiertas de lectura (ORF, *open reading frame*) parcialmente solapantes. La primera de ellas codifica la proteína **VP5** (145 aa, 17 kDa), una proteína citolítica de membrana no esencial para la replicación del virus en cultivos celulares (Mundt *et al.*, 1997), implicada en la liberación de la progenie viral *in vivo* (Lombardo *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2009), y en la inhibición de la apoptosis en estadios iniciales de la infección, mediante la interacción

con canales aniónicos dependientes de voltaje (Li *et al.*, 2012; Liu y Vakharia, 2006; Wei *et al.*, 2011). La unión de VP5 a la membrana viene determinada por un dominio policationico localizado en la región carboxilo terminal de VP5, que presenta afinidad por fosfoinosítidos (Méndez *et al.*, 2015). La segunda ORF codifica una poliproteína de 1012 aa (107 kDa) que se autoprocasa proteolíticamente de manera cotraduccional mediante la acción de la proteasa viral **VP4** (244 aa, 25 kDa) para dar lugar a las proteínas **pVP2**, proteína precursora de VP2, la proteína de la cápsida (512 aa, 54 kDa), **VP4** y **VP3** (256 aa, 28 kDa) (Kibenge *et al.*, 1988; Luque *et al.*, 2009a).

El **segmento B** contiene una única ORF que codifica la polimerasa viral **VP1** (879 aa, 97 kDa; (Morgan *et al.*, 1988; Muller y Nitschke, 1987). Al igual que las polimerasas de otros virus dsRNA, VP1 cataliza tanto la transcripción como la replicación del genoma viral (Garriga *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007; Spies *et al.*, 1987).

1.3.2 Componentes estructurales de IBDV

La partícula infectiva de IBDV carece de envuelta lipídica. Los componentes mayoritarios del virión son VP2 (junto con una pequeña cantidad de pVP2) y VP3; la proteasa VP4 y la polimerasa VP1 se encuentran en menor proporción (Dobos *et al.*, 1979) (Figura 3A). La cápsida de IBDV presenta un diámetro externo de ~70 nm y está formada únicamente por trímeros de VP2/pVP2 (Coulibaly *et al.*, 2005; Saugar *et al.*, 2005) siguiendo una topología molecular basada en un número de triangulación $T=13$ *levo* (Böttcher *et al.*, 1997; Castón *et al.*, 2001) (Figuras 3B, C). Considerando la geometría de la cápsida y las interacciones entre los trímeros de VP2 se pueden distinguir cinco clases de trímeros (a-e), que se organizan formando 20 pentámeros y 120 hexámeros (Figura 3C). La estequiometría de la partícula viral incluye 780 copias de VP2/pVP2, ~450 copias de VP3, ~12 copias de VP1 y un número variable, entre 30-60 copias, de VP4 (Luque *et al.*, 2009a). En el virión maduro, VP1 se encuentra también unida al dsRNA (Xu *et al.*, 2004), recubierto por VP3 formando RNPs (Luque *et al.*, 2009b) (Figura 3D).

La proteína de la cápsida se sintetiza como un precursor, **pVP2** (512 aa), que es procesado postraduccionalmente en su extremo carboxilo terminal para dar lugar a la forma madura, **VP2** (441 aa). Esta maduración está mediada por varias proteasas virales y celulares. Además de la diana Ala-Ala del enlace peptídico 512-513, la proteasa viral VP4 puede llevar a cabo el procesamiento en las dianas secundarias 501-502, 494-495 y 487-488 (Sánchez y Rodríguez, 1999). La enzima aminopeptidasa sensible a puromicina (PurSA), presente en las células susceptibles a infección por IBDV, proteoliza el enlace entre los residuos Arg452-Arg453

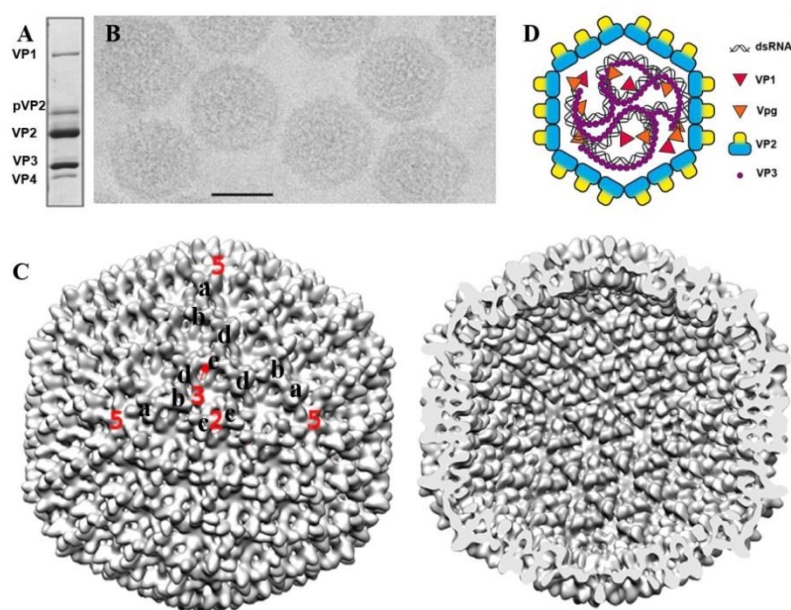


Figura 3. Estructura de la cápsida de IBDV. (A) Análisis mediante SDS-PAGE de viriones purificados de IBDV donde se indican las bandas correspondientes a las proteínas estructurales. (B) Imagen de criomicroscopía electrónica (crioME) de viriones de IBDV. (C) Estructura tridimensional de la superficie externa (izquierda) e interna (derecha) de la partícula de IBDV indicando los ejes de simetría de orden 2, 3 y 5 así como los 5 tipos de trímeros de VP2 (a-e). (D) Modelo de la partícula de IBDV que encapsida cuatro RNPs formadas por el dsRNA, VP3 y VP1 en su forma VPg.

generando una forma intermedia de 452 aa (Irigoyen *et al.*, 2012). El procesamiento final entre los residuos Ala441-Phe442 lo lleva a cabo la propia VP2 mediante una actividad autoproteolítica en *cis* a través del residuo catalítico Asp431 (Irigoyen *et al.*, 2009). Los pequeños péptidos liberados durante la maduración, que dan cuenta de un tamaño total de 7.4 kDa y están constituidos por varias hélices α , permanecen asociados a la partícula viral (Da Costa *et al.*, 2002), y están implicados en la desestabilización de la membrana celular para facilitar la entrada del virus (Chevalier *et al.*, 2005; Galloux *et al.*, 2007).

La estructura atómica de **VP2** fue resuelta a partir de subpartículas virales (SVPs) mediante cristalografía de rayos X. Las SVPs son cápsidas icosaédricas con simetría T=1 constituidas por 60 copias de VP2 (códigos PDB de acceso 1WCD, 2GSY y 2DF7; Coulibaly *et al.*, 2005; Garriga *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). VP2 está organizada en tres dominios denominados protuberante (*protruding*, P), armazón (*shell*, S) y basal (*base*, B). Los dominios P y S son barriles β orientados de forma perpendicular (P) y tangencial (S) a la superficie de la cápsida. El dominio B comprende los extremos amino y carboxilo terminales de VP2, ambos organizados en una sucesión de hélices α dispuestas hacia el interior de la partícula viral (Coulibaly *et al.*, 2005; Garriga *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006) (Figura 4). La unidad básica del ensamblaje de IBDV es un trímero de VP2. Este trímero está estabilizado por grandes superficies de contacto a lo largo de los dominios S y B y reforzada por la coordinación de un ión Ca^{2+} con dos residuos

ácidos (Asp31 y Asp 174) aportados por el dominio P de cada monómero. La estructura de la cápsida se encuentra estabilizada mediante contactos laterales intertriméricos entre los dominios S y B, y por el intercambio molecular (*molecular swapping*) de una hélice $\alpha 4$ de cada monómero entre trómeros adyacentes (Coulibaly *et al.*, 2005; Garriga *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006).

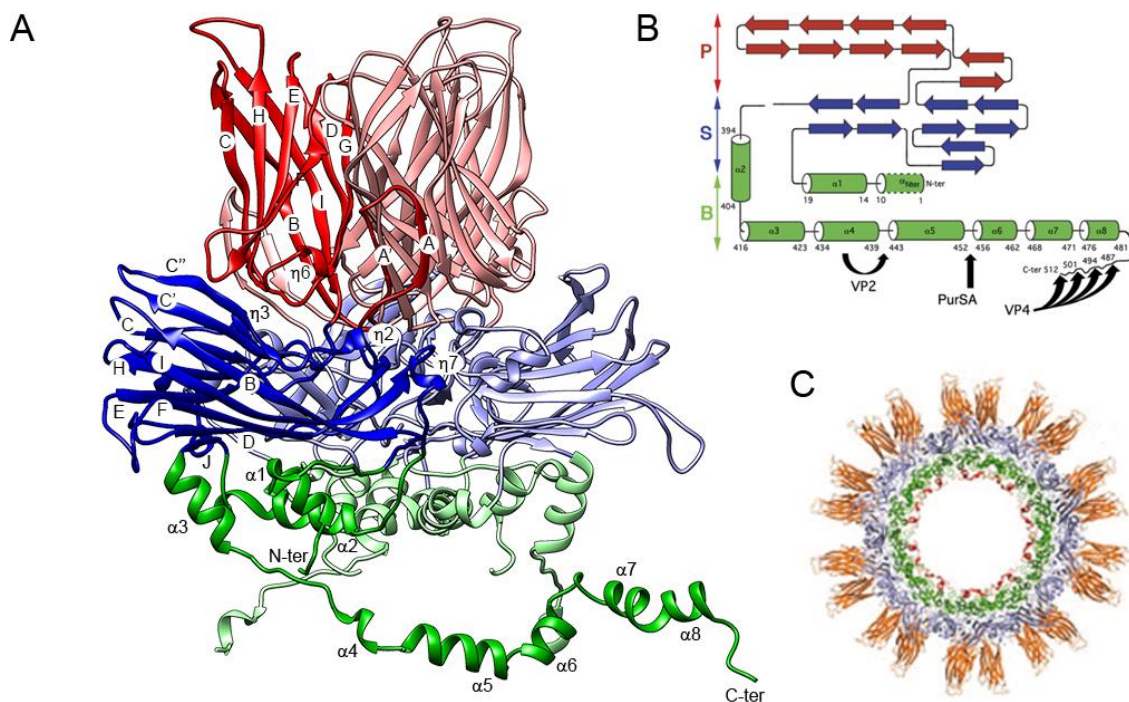


Figura 4. Estructura de VP2. (A) Trómero de la estructura atómica de VP2 de 452 residuos (código PDB de acceso: 2GSY; Garriga *et al.*, 2006). Una molécula de VP2 tiene unida manualmente la región carboxilo terminal de pVP2 ($\alpha 5$ - $\alpha 8$) determinada por NMR (código PDB de acceso: 2IMU; Galloux *et al.*, 2007). En rojo, azul y verde se indican los dominios P, S y B respectivamente. (B) Diagrama topológico de VP2 donde se indican los elementos de estructura secundaria. Los dominios P y S están constituidos por barriles β , mientras que el dominio B está compuesto por hélices α ; las flechas indican los sitios de procesamiento de la región carboxilo terminal de pVP2 por parte de VP4, PurSA y la propia VP2. (C) Sección transversal de la SVP T=1 de VP2 donde se muestra la disposición de los dominios y las interacciones intermoleculares de las regiones S y B (adaptado de Garriga *et al.*, 2006 e Irigoyen *et al.*, 2012).

La proteasa viral, **VP4**, es una serín-endoproteasa no canónica cuya región carboxilo terminal presenta una alta homología con el dominio proteasa de las proteasas Lon bacterianas pero carece del dominio ATPasa característico de las mismas (Birghan *et al.*, 2000; Lejal *et al.*, 2000). Su centro activo está formado por una díada catalítica constituida por la Ser 140 y la Lys 180 (residuos 652 y 692 en la poliproteína), en lugar de la tríada serina-histidina-aspartato de otras serín-proteasas (Ekici *et al.*, 2008). VP4 proteoliza la poliproteína viral tanto en *cis* como en *trans* en los motivos Ala-Ala localizados entre los residuos 512-513 y 755-756 de manera autocatalítica y cotraduccional (Birghan *et al.*, 2000; Lejal *et al.*, 2000; Sánchez y Rodríguez, 1999). Además, la región carboxilo terminal de pVP2 presenta tres dianas secundarias que son

procesadas por VP4 de manera postraduccional. VP4 es un componente estructural del virión aunque la estequiometría con la que se encapsida es altamente variable (Luque *et al.*, 2009a). En células infectadas con IBDV se han observado, además de las cápsidas T=13I, dos tipos de estructuras helicoidales denominadas tubos tipo I (~70 nm de diámetro) y tubos tipos II (~25 nm de diámetro) constituidos por pVP2 y VP4 respectivamente (Granzow *et al.*, 1997). La estructura cuaternaria de estos complejos macromoleculares fue resuelta recientemente en nuestro laboratorio, y además se dispone de las estructuras atómicas de varias VP4 de diferentes miembros de la familia *Birnaviridae* (Chung y Paetzel, 2011; Feldman *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). Los ensamblados helicoidales de VP4, definidos por una elevación axial de 18.4 Å y un ángulo de rotación de 40.6°, están constituidos por tres hebras dextrógiras. El bloque estructural básico es un dímero de VP4, en el que el extremo amino terminal participa en las interacciones intradiméricas, mientras que la integridad de la hélice está mediada por interacciones interdiméricas entre la región del carboxilo terminal de dímeros adyacentes de la misma hebra. En los ensamblados helicoidales, la hendidura superficial de VP4 (donde se localiza el sitio activo) tiene bloqueado su acceso constituyendo una forma de inactivación de su actividad proteasa (Figura 5) (Castrillo, 2013, tesis doctoral).

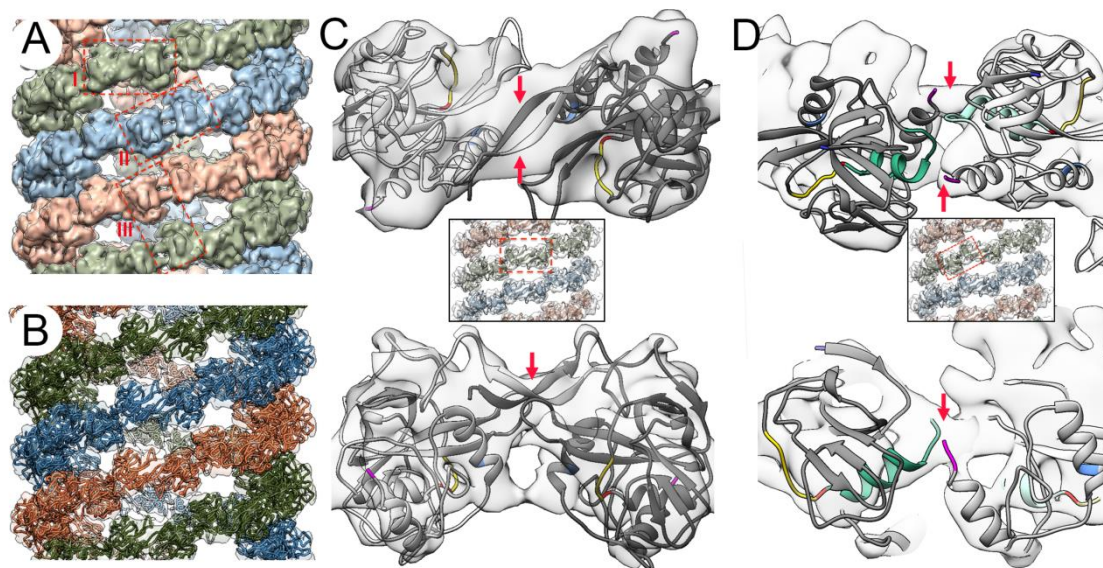


Figura 5. Mapa tridimensional de los filamentos helicoidales de VP4 de IBDV. (A) Las tres hélices principales que conforman el ensamblado helicoidal se muestran en azul, naranja y verde. Los tres tipos posibles de dímeros de VP4 se indican: I (verde), II (azul) y III (naranja y verde). El dímero I es probablemente el dímero natural de VP4. (B) Modelo pseudo-atómico híbrido del tubo de VP4 obtenido mediante modelado por homología con los modelos atómicos de otras VP4 de birnavirus. (C) Dímero tipo I en el que las interacciones están mediadas por la región N-terminal de VP4 (flechas rojas). Se muestran las vistas de superficie (arriba) y lateral (abajo). (D) Dímero tipo II en el que las interacciones están mediadas por la región C-terminal de VP4 (flechas rojas). Se muestran las vistas de superficie (arriba) y lateral (abajo).

La RdRp **VP1** se encuentra tanto soluble en la partícula viral como asociada covalentemente al genoma, denominada VPg (Calvert *et al.*, 1991; Muller y Nitschke, 1987). La resolución de su estructura atómica mostró una permutación de los motivos que componen el dominio catalítico (dominio *palma*) que la diferencia de las RdRps de otros virus dsRNA (Garriga *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2007). VP1 cataliza la transcripción y replicación del genoma viral, es capaz tanto de autoguanidilarse y actuar como cebador para la síntesis de RNA como de catalizar la reacción de polimerización sin necesidad de otras proteínas virales o factores del huésped (Dobos, 1993; Luque *et al.*, 2009b; Pan *et al.*, 2007; Shwed *et al.*, 2002; Spies y Muller, 1990; Spies *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 2004). Tras este proceso, la proteína VP1 que ha actuado como cebador permanece covalentemente unida a los extremos 5' del RNA viral de nueva síntesis como VPg (Dobos, 1993; Dobos, 1995; Graham *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2009b; Xu *et al.*, 2004).

1.3.3 La proteína multifuncional VP3

La proteína **VP3** está implicada en numerosos procesos esenciales en el ciclo viral. Durante el ensamblaje de la partícula viral, VP3 es una proteína de andamiaje; esta función está mediada por interacciones electrostáticas entre los residuos de carácter ácido de su extremo carboxilo terminal con la hélice anfipática $\alpha 5$ que comprende los residuos 443-452 en el extremo carboxilo terminal de pVP2 (Oña *et al.*, 2004; Saugar *et al.*, 2010; Saugar *et al.*, 2005). Además, VP3 tiene la capacidad de interactuar consigo misma formando dímeros y oligómeros (Casañas *et al.*, 2008; Tacken *et al.*, 2002) (Figura 6), con VP1 a través de su región carboxilo terminal funcionando como un activador transcripcional (Bahar *et al.*, 2013; Ferrero *et al.*, 2015a; Garriga *et al.*, 2007; Maraver *et al.*, 2003a; Tacken *et al.*, 2000) y con el dsRNA constituyendo las RNPs virales (Hjalmarsson *et al.*, 1999; Luque *et al.*, 2009b; Pedersen *et al.*, 2007).

El complejo formado por VP3, VP1 y el dsRNA (*e.g.*, las RNPs) es transcripcionalmente activo (Luque *et al.*, 2009b). VP3 interactúa con el dsRNA a través de residuos básicos agrupados en dos regiones de la superficie de la proteína (residuos Lys99, Arg102, Lys105 y Lys106, pertenecientes al *patch1*; y Arg159, Arg168, His198 y Arg200, pertenecientes al *patch2*) (Valli *et al.*, 2012). Debido a estas características, VP3 suprime el silenciamiento por RNAs mediante la unión a fragmentos de dsRNA (Bronkhorst y van Rij, 2014; Valli *et al.*, 2012; van Cleef *et al.*, 2014) e impide la fosforilación de la proteína quinasa dependiente de dsRNA (PKR) y del factor IF2 α , siendo responsable de la actividad anti-apoptótica (Busnadiego *et al.*, 2012). Además, VP3 es capaz de interactuar con factores específicos del huésped como la proteína L4 de la subunidad grande del ribosoma (Chen *et al.*, 2016), o el factor implicado en

diferenciación en melanoma MDA5, compitiendo por la unión a dsRNA y bloqueando la respuesta inmune inhibiendo la inducción de interferón β (Ye *et al.*, 2014).

VP3 puede considerarse, por tanto, una proteína multifuncional (*moonlighting protein*; (Mani *et al.*, 2015) similar a las nucleoproteínas de los paramixovirus (Communie *et al.*, 2014). Estas proteínas multifuncionales son cadenas polipeptídicas únicas capaces de llevar a cabo diferentes funciones en diferentes localizaciones o tipos celulares, por la interacción con otras proteínas o por el cambio de concentración de un determinado ligando, sustrato, cofactor o producto de reacción, y no debido a fusiones génicas, efectos pleiotrópicos o variaciones de *splicing* (Jeffery, 1999). Esta multifuncionalidad se debe al desorden estructural intrínseco que presentan muchas de estas proteínas en determinadas regiones, lo que en ciertos casos les permite activar e inactivar el mismo factor específico (Tomba *et al.*, 2005), convirtiéndolas en objetivos de gran interés en el estudio de múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer (Min *et al.*, 2016).

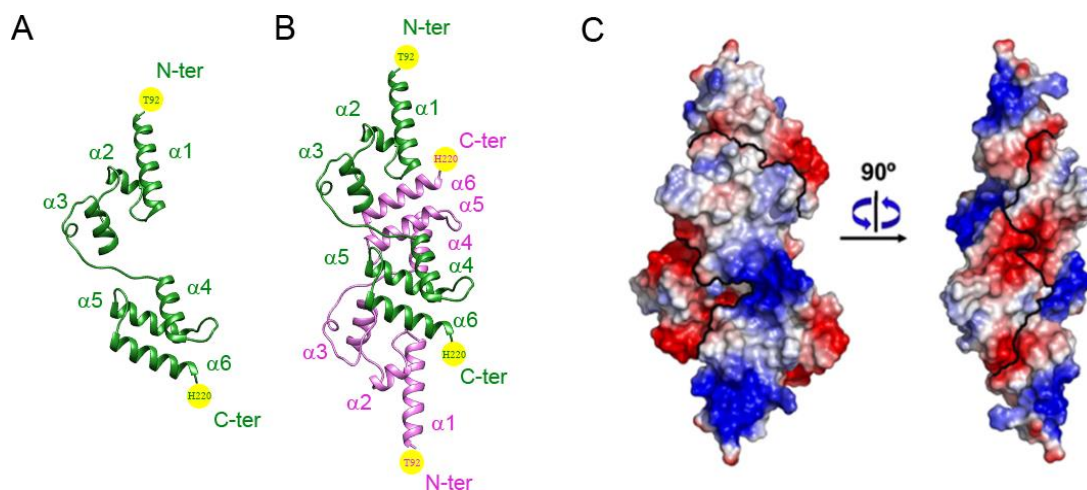


Figura 6. Estructura de VP3. (A) Estructura atómica de la región central de VP3 que comprende un 49.8% de la proteína completa (residuos T92-H220) donde se aprecian los dos dominios helicoidales unidos entre sí por un bucle flexible. (B) Estructura atómica del dímero de VP3 resuelto por cristalografía de rayos X. (C) Dos vistas de la superficie del dímero de VP3 (adaptado de Casañas *et al.*, 2008).

1.3.4 Polimorfismo estructural de la proteína de la cápsida de IBDV

Los mecanismos moleculares que controlan el polimorfismo estructural de la cápsida de IBDV han sido caracterizados a partir de sistemas de expresión recombinantes basados en baculovirus (rBVs) y virus vaccinia (rVV) (Chevalier *et al.*, 2005; Chevalier *et al.*, 2004; Chevalier *et al.*, 2002; Da Costa *et al.*, 2002; Galloux *et al.*, 2007; Irigoyen *et al.*, 2009; Luque *et al.*, 2007; Oña *et al.*, 2004; Saugar *et al.*, 2010; Saugar *et al.*, 2005). La expresión de la poliproteína de IBDV en células de mamífero mediante un rVV da lugar a VLPs estructuralmente idénticas a la cápsida del virión formadas por pVP2, VP2 y VP3 (Castón *et al.*, 2008). En este contexto celular el procesamiento de la poliproteína es completo y por tanto se generan correctamente

todas las proteínas estructurales (Fernández-Arias *et al.*, 1998). Además, la co-expresión del rVV que expresa la poliproteína con un rVV que expresa VP1 da lugar a VLPs que incorporan VP1 (Lombardo *et al.*, 1999).

La expresión de la poliproteína en células de insecto mediante el uso de rBVs, sin embargo, da lugar mayoritariamente a tubos rígidos de ~50 nm de diámetro con un ordenamiento helicoidal (Chevalier *et al.*, 2002; Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000), similares a los observados en células infectadas con IBDV a tiempos post-infección largos (Granzow *et al.*, 1997). La baja eficiencia de formación de cápsidas en este sistema se atribuye a varios factores, como la ausencia o el funcionamiento deficiente de un factor necesario para la formación de pentámeros a partir de pVP2, la proteasa celular PurSA (Irigoyen *et al.*, 2012), o el procesamiento proteolítico del dominio carboxilo terminal de VP3 (Maraver *et al.*, 2003b; Tacken *et al.*, 2002; Tacken *et al.*, 2000), fundamental para su función de andamiaje.

La expresión de VP2 mediante rBVs en ausencia de otras proteínas virales da lugar a la formación de SVPs de ~26 nm de diámetro y geometría T=1 (Castón *et al.*, 2001) (Figura 7), donde los trímeros de VP2 están agrupados exclusivamente en pentámeros. La expresión en el mismo sistema de la forma precursora pVP2 da lugar a estructuras tubulares poco regulares donde los trímeros de proteína siguen un ordenamiento hexagonal, indicando que el extremo carboxilo terminal de pVP2 está implicado en el control del polimorfismo estructural inherente a esta proteína. Mediante el estudio de una batería de rBVs que expresan versiones de pVP2 con diferentes extensiones de su extremo carboxilo terminal, desde pVP2 (512 aa) hasta la forma madura VP2 (441 residuos) se determinó que el interruptor molecular (*molecular switch*) que dirige el ensamblaje de trímeros de VP2 en hexámeros o pentámeros está localizado en la hélice anfipática $\alpha 5$, que comprende la región ⁴⁴³GFKDIIRAIR⁴⁵² de pVP2 (Galloux *et al.*, 2007; Saugar *et al.*, 2005).

La hélice anfipática $\alpha 5$ por sí sola no es suficiente para el ensamblaje de cápsidas T=13. Aunque las formas de longitud intermedia VP2-456 y VP2-466 pueden ensamblarse tanto en pentámeros (SVPs T=1) como en hexámeros (estructuras tubulares), éstos no se combinan de manera eficiente para el ensamblaje de cápsidas T=13. Para ello, las distintas versiones de VP2 deben expresarse con un *tag* de His unido covalentemente a su extremo amino terminal, denominadas HT-VP2-456 y HT-VP2-466 (Saugar *et al.*, 2005). El *tag* de His comparte cierta similitud con el extremo carboxilo terminal de VP3 y ambos pueden ser intercambiados (Saugar *et al.*, 2010). La función (transitoria) de andamiaje mediada por VP3 tiene lugar mediante interacciones electrostáticas de sus residuos ácidos Asp242 y Asp245 con los residuos básicos Lys445 y Arg449 de la hélice $\alpha 5$ anfipática de pVP2 (Saugar *et al.*, 2010).

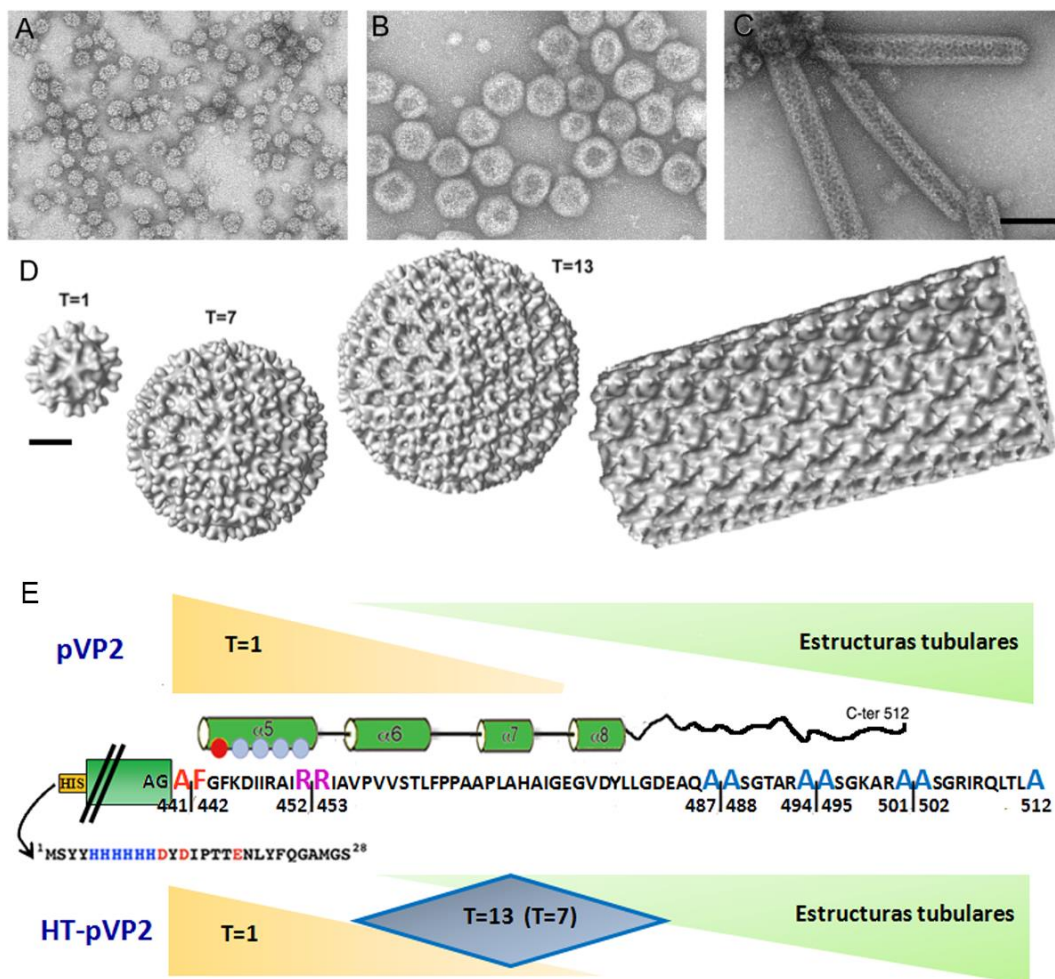


Figura 7. Estructuras derivadas de la expresión de formas de pVP2 con extremos carboxilo terminal de distinta longitud. (A-C) Imágenes de tinción negativa de las diferentes estructuras derivadas de la expresión de pVP2. La barra de escala representa 100 nm. (A) La expresión de un rBV que expresa la forma madura de VP2 (441 aa) da lugar a cápsidas T=1, producto del ensamblaje de los trímeros de VP2 en pentámeros. (B) Para que pentámeros y hexámeros se combinen de forma eficiente en cápsidas T=13 se requiere la expresión de formas de pVP2 de longitud intermedia (456-476 aa) fusionadas a un *tag* de His en su extremo amino terminal. (C) La expresión en el mismo sistema de la proteína precursora completa, pVP2 (512 aa), da lugar a ensamblados tubulares con un patrón hexagonal. (D) Reconstrucciones tridimensionales de los diferentes ensamblados descritos a partir de imágenes de criomicroscopía electrónica. La barra de escala representa 10 nm. (E) Esquema de los elementos implicados en el polimorfismo estructural de pVP2. Secuencia del extremo C-terminal 441-512 de pVP2 donde se resaltan en color las dianas de procesamiento de la proteína. Las regiones 443-452, 456-462, 468-471 y 476-481 conforman las hélices $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ y $\alpha 8$, respectivamente. El interruptor molecular que determina el polimorfismo es la hélice anfipática $\alpha 5$, que permite el ensamblaje de cápsidas T=13 cuando interacciona con residuos ácidos del *tag* de His (en rojo), y que mimetiza al extremo C-terminal de VP3.

Los numerosos estudios realizados para caracterizar las interacciones entre los diferentes componentes de IBDV han permitido establecer un modelo de ensamblaje de la partícula viral. En IPNV se ha caracterizado bioquímicamente un estadio morfogénético que sugiere la formación de una procápsida esférica (Villanueva *et al.*, 2004). Por otra parte, a partir de un rBV basado en el vector AcMY-Poly (Martínez-Torrecuadrada *et al.*, 2000) se han caracterizado estructuras de morfología similar a la procápsida, constituidas por precursores proteicos que

incluyen la poliproteína completa, pVP2, y la proteína de fusión VP4-VP3 (Castrillo, 2013, tesis doctoral). En las primeras etapas del ensamblaje la interacción electrostática entre los extremos carboxilo terminal de pVP2 y VP3 supone la formación de una partícula con una doble capa proteica, donde VP3 estaría recubriendo la superficie interna de la cápsida formada por VP2. Esta interacción retardaría el procesamiento del extremo carboxilo terminal de VP2 y por tanto permitiría el ensamblaje de hexámeros. Las moléculas de pVP2 que establecen interacciones lábiles con VP3 serían susceptibles de ser proteolizadas en la posición 452-453 en un proceso mediado por la proteasa PurSA, dando lugar a pentámeros, que actuarían como centros nucleadores del ensamblaje (Irigoyen *et al.*, 2012) (Figura 8). Una vez ensamblada la procápsida, la interacción con VP3 se debilitaría, favoreciendo el procesamiento del extremo carboxilo terminal de pVP2 y resultando en la maduración total de la cápsida.

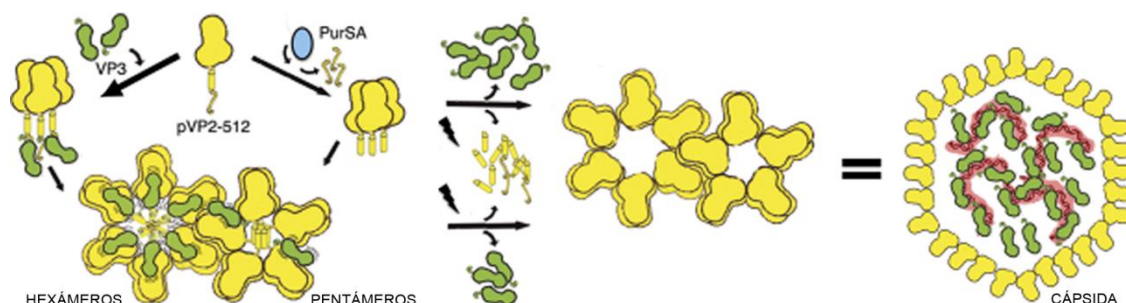


Figura 8. Modelo para el ensamblaje de IBDV. La proteína de la cápsida de IBDV es sintetizada como un precursor, pVP2 (512 aa, amarillo). El procesamiento del carboxilo terminal (representado como un cilindro con cola) de dicho precursor por parte de la proteasa viral, la proteasa celular PurSA (azul) y la propia pVP2, da lugar a la proteína madura. La proteína VP3 (verde) posee funciones de andamiaje e interacciona con el extremo carboxilo terminal de pVP2 coordinando el ensamblaje. Un rápido procesamiento de pVP2 por parte de PurSA favorece su ensamblaje en pentámeros, mientras que la interacción de VP3 con pVP2 garantiza que dicho procesamiento sea lento lo que favorece el ensamblaje de los trímeros en hexámeros (adaptado de Irigoyen *et al.*, 2012).

1.4 Relaciones estructurales y funcionales de IBDV con los virus ssRNA y dsRNA

Los virus dsRNA son un grupo muy amplio que comprende desde los reovirus de mamíferos y diversos virus de hongos, hasta los bacteriófagos $\phi 6$ y $\phi 8$, pero con numerosos patrones funcionales y estructurales similares (Prasad y Prevelige, 2003). En todos los casos, la ausencia en el huésped de la maquinaria necesaria para la replicación y transcripción del dsRNA, les obliga a incluir su propia RdRp en el interior de una nucleocápsida con número de triangulación $T=1$ y constituida por 60 subunidades diméricas, única estructura conservada en todos ellos (cápsida “ $T=2$ ”) (Figura 9). Se ha descrito la estructura atómica de las nucleocápsidas del virus de la lengua azul (orbivirus, bluetongue virus, BTV; Grimes *et al.*, 1998), del aquareovirus de la carpa herbívora (grass carp reovirus, GCRV; Cheng *et al.*, 2010), de $\lambda 1$ (Orthoreovirus;

Reinisch *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005), del virus enano del arroz (rice dwarf virus, RDV; Nakagawa *et al.*, 2003), del virus de la poliedrosis citoplasmática (cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV; Yu *et al.*, 2008), de rotavirus (McClain *et al.*, 2010), del partitivirus F del hongo *Penicillium stoloniferum* (PsV-F; Pan *et al.*, 2009a), del picobirnavirus de conejo (PBV; Duquerroy *et al.*, 2009), del virus L-A de *Saccharomyces cerevisiae* (Naitow *et al.*, 2002), del virus del hongo *Penicillium chrysogenum* (PcV; Luque *et al.*, 2014) y de los bacteriófagos $\phi 6$ (Nemecek *et al.*, 2013) y $\phi 8$ (El Omari *et al.*, 2013). La organización específica del genoma viral en esta nucleocápsida a lo largo del ciclo viral permite a los virus dsRNA evitar los mecanismos de defensa inmune del huésped (Prasad y Prevelige, 2003).

Los birnavirus son una excepción ya que tienen una única cápsida T=13, en la que VP2 presenta similitudes estructurales con la proteína de la cápsida de virus (+) ssRNA en sus dominios S y B (nodavirus y tetravirus), y con la proteína de la cápsida de virus dsRNA de la familia Reoviridae en su dominio P (Coulibaly *et al.*, 2005). En nodavirus y tetravirus, como en IBDV, las hélices α dispuestas hacia el interior de la cápsida generan canales hidrofílicos en los ejes pentaméricos que sugieren su posible implicación en la translocación de ssRNA de nueva síntesis (Coulibaly *et al.*, 2005; Garriga *et al.*, 2006; Munshi *et al.*, 1996). IBDV también comparte con nodavirus y tetravirus un genoma bisegmentado (Fauquet y Fargette, 2005) y la maduración proteolítica de la proteína de la cápsida mediada por ella misma (Gallagher y Rueckert, 1988; Irigoyen *et al.*, 2009; Schneemann *et al.*, 1998; Zlotnick *et al.*, 1994).

Tanto el análisis de secuencia (Gorbalenya *et al.*, 2002) como la resolución de las estructuras de las RdRps de los birnavirus IBDV e IPNV (Garriga *et al.*, 2007; Graham *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2007) han determinado que ambas enzimas pertenecen a un grupo de polimerasas no canónicas, definidas por la permutación de los motivos que componen el dominio catalítico de la palma. Esta permutación sólo ha sido identificada en virus (+) ssRNA, el timovirus de la vid (Sabanadzovic *et al.*, 2009), y los tetravirus de insectos de *Euprosterina elaeasa* (Zeddami *et al.*, 2010) y de *Thosea asigna* (Ferrero *et al.*, 2015b). A pesar de esta organización similar, la arquitectura general del sitio activo de VP1 presenta mayor similitud con los virus (+) ssRNA de las familias picornavirus y calicivirus (Ferrer-Orta *et al.*, 2015; Garriga *et al.*, 2007; Graham *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2007). Estudios comparativos de RdRps (Gorbalenya *et al.*, 2002), sugieren que las RdRps canónicas relacionadas con flavivirus podrían haber originado las RdRps no canónicas, coexistiendo ambos tipos y sugiriendo la probable existencia de un ancestro común a los birnavirus, tetravirus y flavivirus (Ferrero *et al.*, 2015b).

En los birnavirus, la organización de su material genómico formando RNPs mediante la asociación de VP3 y VP1 al dsRNA (Luque *et al.*, 2009b), debe de ser funcionalmente

equivalente a la nucleocápsida T=2 respecto a la replicación y transcripción del genoma viral. Esta característica estructural no se ha observado en otros virus dsRNA, pero es común en virus (-) ssRNA. Los virus (-) ssRNA se dividen en virus con un genoma no segmentado (*Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae* y *Nyamiviridae*) y virus con genoma segmentado (*Arenaviridae*, *Bunyaviridae* y *Orthomyxoviridae*), e incluyen importantes patógenos humanos como gripe, sarampión, paperas, virus respiratorio sincitial, rabia o ébola (Ortín y Martín-Benito, 2015). Por lo general, las nucleoproteínas (o RNPs) de estos virus están organizadas siguiendo una conformación helicoidal, lineal y rígida en los virus con genoma no segmentado (Schoehn *et al.*, 2004; Tawar *et al.*, 2009), y circular y flexible en los segmentados (Raymond *et al.*, 2010). Las RNPs del virus de la gripe presentan una estructura de doble hélice levógira formada por dos cadenas de polaridad opuesta con un surco menor entre cadenas conectadas y un surco mayor entre cadenas no conectadas (Arranz *et al.*, 2012; Coloma *et al.*, 2009). Respecto a la polimerasa viral, mientras que en la mayoría de virus (-) ssRNA la RdRp es una proteína multicatalítica, en ortomyxovirus existen tres proteínas individuales asociadas en un heterotrímero constituido por PA (endonucleasa), PB1 (RdRp) y PB2 (capping) (Coloma *et al.*, 2009; Guu *et al.*, 2008). PA y PB1 muestran cierta equivalencia con las RdRps de los virus dsRNA (Butcher *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2002).

Como continuación de estudios previos de nuestro laboratorio, el presente trabajo ha abordado la caracterización de VP3 como proteína de andamiaje durante el ensamblaje de la cápsida mediante el análisis de las distintas poblaciones de IBDV generadas en una infección natural (E1-E6, clasificadas según su contenido en RNPs). Además, las RNPs de IBDV han sido caracterizadas estructural y funcionalmente, las cuales están constituidas por dsRNA y VP3, así como por VP1/VPg en sus extremos.

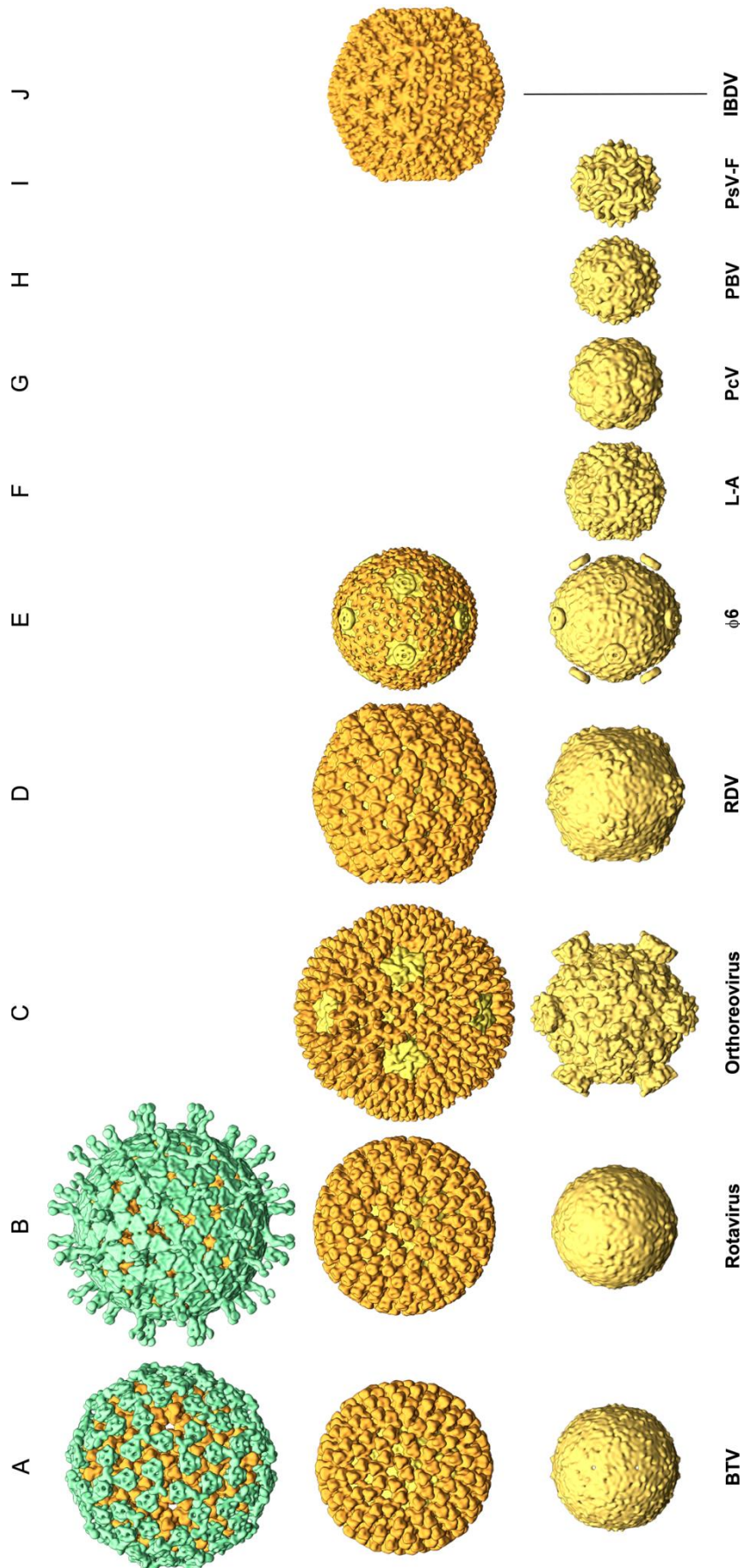


Figura 9. Estructura de virus dsRNA. Mapas de densidad de cápsidas externas (fila superior en verde y fila intermedia en naranja) y nucleocápsidas T=2 internas (fila inferior en amarillo) de virus representativos de las diferentes familias de virus dsRNA filtrados a 20 Å de resolución, calculados a partir del modelo atómico (A-D, F, H-J) o a partir de los mapas de densidad depositados (E y G). (A) Virus de la lengua azul (BTV, N°. Acceso PDB 2BTY y 3IYK; Grimes *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2010). (B) Rotavirus (3N09 y 3IYU; Settembre *et al.*, 2011). (C) Ortoreovirus T1L (IEJ6 y 2CSE; Reinisch *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2005). (D) Virus enano del arroz (RDV, 1UF2; Nakagawa *et al.*, 2003). (E) Bacteriófago φ6 (emd-1206; Huiskonen *et al.*, 2006; Jaalinoja *et al.*, 2007). (F) Virus L-A (1M1C; Naitow *et al.*, 2002). (G) Virus de *Penicillium chrysogenum* (PcV, emd-1610; Luque *et al.*, 2010). (H) Picobirnavirus (PBV, 2VF1; Duquerroy *et al.*, 2009). (I) Virus F de *Penicillium stoloniferum* (PsV-F, 3ES5; Pan *et al.*, 2009a). (J) Virus de la Bursitis Infecciosa (IBDV, 1WCE; Coulibaly *et al.*, 2005). La nucleocápsida interna T=2 está presente en todas las estructuras resueltas (A-I) a excepción de IBDV (J).

2. Objetivos

La singularidad más patente desde el punto de vista estructural y funcional de los virus dsRNA está representada por IBDV, donde confluyen características típicas de virus RNA de cadena sencilla de polaridad positiva y negativa. La organización del material genético en complejos ribonucleoproteicos (RNPs), así como la falta de una cápsida T=1 (con 120 subunidades) son características únicas de IBDV. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que el programa genético de IBDV está dirigido para empaquetar dentro de cada cápsida el mayor contenido genómico posible en forma de RNP. Durante una infección natural aproximadamente el 80% de los viriones producidos contienen más de un genoma completo (poblaciones E4-E6), mientras que el resto de las partículas virales contienen, de forma gradual, un menor número de RNPs (poblaciones E3-E1). En este trabajo hemos abordado el análisis bioquímico y estructural de las diferentes poblaciones de IBDV para estudiar la multifuncionalidad de VP3. Para ello hemos seguido técnicas de microscopía electrónica convencional (mediante tinción negativa), de criomicroscopía electrónica (crioME) de partículas aisladas, de criotomografía electrónica (crioTE) y de microscopía de fuerzas atómicas (AFM). La disposición de la proteína multifuncional VP3 en un sistema relativamente sencillo, compuesto por cinco proteínas VP1-VP5 y dos moléculas de dsRNA, hace de IBDV un modelo óptimo para establecer los factores que modulan la multifuncionalidad de VP3.

El objetivo general de este trabajo se centra en la caracterización de la multifuncionalidad de VP3. En este contexto, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Análisis de la función de VP3 como proteína de andamiaje durante el ensamblaje de la cápsida de IBDV. Estudio de las poblaciones naturales de IBDV mediante crioTE y caracterización de la población E1 por crioME y AFM.
2. Análisis bioquímico, estructural y funcional de las RNPs de IBDV. Caracterización de la función de VP3 en la actividad e infectividad de las RNPs y obtención de un modelo tridimensional de VP1/VPg a partir de imágenes de microscopía electrónica.
3. Estudio de las diferentes poblaciones naturales de IBDV mediante AFM y caracterización de la influencia de las RNPs en las propiedades mecánicas de la cápsida del virión.

3. Materiales y Métodos

3.1 Material biológico

3.1.1 Células eucariotas

La expresión de baculovirus recombinantes (rBVs) se realizó en células de insecto HighFive (H5, *Invitrogen*) derivadas de *Trichoplusia ni* (ATCC, CRL-1711). Las infecciones con IBDV fueron llevadas a cabo en la línea celular QM7 derivada de fibroblastos musculares de *Coturnix japonica* (codorniz japonesa) (ATCC, CRL-1962) (Antin y Ordahl, 1991). Para la infección con virus vaccinia recombinantes (rVVs) se utilizó la línea celular de mamífero BSC-40, derivada de células epiteliales renales de *Cercopithecus aethiops* (ATCC, CRL-2761) (Brockman y Nathans, 1974).

Las células H5 fueron cultivadas a 28 °C en medio TC-100 (*GIBCO-BRL*) suplementado con suero fetal bovino (FCS, *Sigma*) al 10%, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y fungizona (1 µg/ml). Los cultivos celulares de QM7 y BSC-40 fueron mantenidos a 37 °C en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; (Dulbecco y Freeman, 1959) suplementado con 10% de FCS, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml), fungizona (1 µg/ml) y aminoácidos no esenciales.

3.1.2 Virus

Las infecciones con IBDV se realizaron con la cepa *Soroa* (Lombardo *et al.*, 1999) adaptada a cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de pollo.

El rVV vT7/LacOI/Poly se ha utilizado en el presente trabajo para obtener VLPs de IBDV mediante la expresión inducible de la poliproteína de IBDV en células de mamífero (Lombardo *et al.*, 1999).

El rBV HT-VP1 ha sido descrito para la obtención de la forma completa de VP1 fusionada a un tag de His en su extremo N-terminal en células de insecto (Garriga *et al.*, 2007).

El rVV vT7/LacOI/HT-VP3 ha sido descrito para la obtención de la forma completa de VP3 fusionada a un tag de His en su extremo N-terminal en células de mamífero (Garriga *et al.*, 2007).

3.1.3 Anticuerpos

Los antisueros de conejo frente a las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 han sido descritos previamente (Fernández-Arias *et al.*, 1998; Sánchez y Rodríguez, 1999).

3.3 Infecciones y expresión de proteínas

3.3.1 Infección con rBV

Cultivos preconfluentes de células H5 se infectaron a una multiplicidad de infección (moi) de 1-5 unidades formadoras de placa por célula (pfu/cel) del rBV correspondiente en un volumen mínimo de TC-100. Transcurrida 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y medio TC-100 suplementado con 2% de FCS fue añadido. Las células fueron recogidas a 48 horas post-infección (hpi).

3.3.2 Infección con rVVs

Cultivos preconfluentes de células QM7 se infectaron a una moi de 2-5 pfu/cel en un volumen mínimo de DMEM. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% de FCS y 2 mM isopentenil tio- β -galactósido (IPTG). Las células fueron recogidas a las 48 hpi.

Para la generación de stocks de rVVs, cultivos preconfluentes de células BSC-40 fueron infectados a una moi de 0.02 pfu/cel en un volumen mínimo de DMEM. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% de FCS. Las células fueron recogidas a las 72 hpi según el efecto citopático observado.

3.3.3 Infección con IBDV

Para la purificación de viriones de IBDV, cultivos de células QM7 a una confluencia del 70-80% se infectaron a una moi de 1-2 pfu/cel de IBDV en un volumen mínimo. Tras 1 h de adsorción se retiró el inóculo y se añadió DMEM suplementado con 2% de FCS. Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos a las 48-72 hpi según el efecto citopático observado.

Para la producción de stock de IBDV se siguió el mismo procedimiento empleando una moi de 0.02-0.05 pfu/cel y recogiendo los sobrenadantes de cultivo a las 72-96 hpi según el efecto citopático observado.

3.3.4 Titulación de stocks de rVVs e IBDV

Los títulos de los stocks virales fueron determinados mediante ensayos de formación de placa. Se infectaron monocapas de células BSC-40 (rVVs) o QM7 (IBDV) a una confluencia del 50-60% con diluciones seriadas de virus en un volumen mínimo de DMEM. Tras 1 h de adsorción se retiró el inóculo y se añadió agar semisólido a una concentración final de 0.5% en medio DMEM suplementado con 2% de FCS. A las 72 hpi las monocapas fueron fijadas con formaldehído al 10% y teñidas con una solución acuosa de cristal violeta al 2%. El título se determinó mediante recuento de placas de lisis.

3.3.5 Transfección con RNPs y VPg-dsRNA

Las muestras de RNPs y de VPg-dsRNA, obtenidas según los protocolos 3.4.3 y 3.4.4 respectivamente, fueron dializadas durante 16 h frente al tampón 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl a 4 °C. 10 ng de RNA fueron mezclados con liposomas catiónicos compuestos por dimetildioctadecil bromuro (*Sigma*) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (*Sigma*), incubados a 21 °C durante 20 min, y adicionados sobre cultivos de células QM7 a una confluencia del 70-80%. A las 48 y 72 hpi, mientras que los sobrenadantes de los cultivos fueron titulados siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.4, las células fueron resuspendidas en tampón PES (50 mM PIPES pH 6.2, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂) suplementado con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 25 µg/ml DNasa, incubadas durante 30 min a 37 °C y posteriormente analizadas por SDS-PAGE y Western-blot según los protocolos descritos en los apartados 3.5.1 y 3.5.4.

Como controles de transfección se usaron RNPs e IBDV inactivados térmicamente mediante incubación durante 1 h a 100 °C; y digeridos mediante incubación en tampón de digestión (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM MnCl₂, 0.3 mg/ml BSA) con 3000 mU de ShortCut RNase III (*New England Biolabs*) durante 1 h a 37°C. La reacción de digestión fue detenida mediante la adición de 50 mM EDTA.

3.4 Purificación de proteínas y ensamblados virales

3.4.1 Purificación de VLPs derivadas de la expresión de rVV vT7/LacOI/Poly

Cultivos de células QM7 preconfluentes fueron infectados con rVV vT7/LacOI/Poly y recogidos a 60 hpi. Las células se lavaron con tampón PES y se lisaron en tampón PES suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini; Roche*) o 1 mM PMSF mediante la aplicación de 3 ciclos de congelación a -80°C seguida de descongelación a 37 °C. El lisado fue clarificado mediante centrifugación a 3,000 rpm en un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*) (1,000xg) durante 10 min. El sobrenadante obtenido fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 25% en PES y ultracentrifugado a 37,000 rpm en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*) (170,000xg) durante 150 min. El sedimento resultante fue resuspendido en tampón PES, centrifugado en una microfuga a 13,000 rpm (16,000xg) durante 1 min, y el sobrenadante resultante fue cargado sobre un gradiente lineal de sacarosa del 25-50% en PES y sometido a ultracentrifugación a 40,000 rpm en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*) (200,000xg) durante 45 min. El gradiente se fraccionó en 12 alícuotas que se concentraron 20 veces mediante ultracentrifugación a 50,000 rpm en un rotor SW55 (*Beckman-Coulter Inc.*) (240,000xg) durante 2 h. Las fracciones enriquecidas en cápsidas T=13 fueron a su vez purificadas en un gradiente isopícnico de CsCl (Luque *et al.*, 2009a). Las fracciones fueron mezcladas con CsCl

en tampón PES a una densidad inicial de 1.31 g/cc, y la solución resultante ultracentrifugada a 40,000 rpm en un rotor NVT65 (*Beckman-Coulter Inc.*) (130,000xg) durante 14 h. Tras la ultracentrifugación se detectaron dos bandas visibles por refracción de luz (correspondientes a VLPs vacías y llenas, de menor a mayor densidad de flotación). Las bandas fueron recuperadas por punción lateral con agujas hipodérmicas 23G, dializadas 16 h frente a tampón PES y concentradas 10-20 veces mediante ultracentrifugación a 50,000 rpm en un rotor SW55 (*Beckman-Coulter Inc.*) (240,000xg) durante 2 h. Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4 °C (Saugar *et al.*, 2005).

3.4.2 Purificación de viriones de IBDV

El sobrenadante de cultivos de células QM7 infectadas con IBDV durante 72 h (moi: 1-2 pfu/cel) fue mezclado en una relación 1:5 (v:v) con PEG 20%, 3 M NaCl e incubado con agitación 16 h a 4 °C. Posteriormente, la solución fue centrifugada a 3,000 rpm en un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*) (1,000xg) durante 30 min, y el precipitado resultante fue resuspendido en PES, suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini, Roche*) o 1 mM PMSF y nuevamente centrifugado a 3,000 rpm en un rotor basculante 5624 (*Hettich Zentrifugen*) (1,000xg) durante 5 min. El sobrenadante obtenido fue cargado sobre un colchón de sacarosa al 25% en PES y ultracentrifugado a 37,000 rpm en un rotor SW41 (*Beckman-Coulter Inc.*) (170,000xg) durante 150 min. El sedimento resultante fue resuspendido en tampón PES, centrifugado en una microfuga a 13,000 rpm (16,000xg) durante 1 min, y el sobrenadante resultante fue cargado sobre un gradiente lineal de sacarosa del 25-50% en PES y procesado como se describe en las etapas finales del apartado anterior.

Alternativamente, el precipitado obtenido tras la ultracentrifugación en el colchón de sacarosa fue purificado en un gradiente isopícnico de CsCl (Luque *et al.*, 2009a). El precipitado fue resuspendido en PES, centrifugado en una microfuga a 13,000 rpm (16,000xg) durante 1 min y mezclado con CsCl en tampón PES a una densidad inicial de 1.33 g/cc y ultracentrifugado a 40,000 rpm en un rotor NVT65 (*Beckman-Coulter Inc.*) (130,000xg) durante 14 h. Tras la ultracentrifugación se detectaron un total de seis bandas visibles por refracción de luz (denominadas E1 a E6, de menor a mayor densidad de flotación). Las bandas, que incluyen desde cápsidas vacías (E1) a viriones completamente llenos (E5 y E6), fueron recuperadas por punción lateral con agujas hipodérmicas 23G y dializadas 16 h frente a tampón PES. Todas las etapas de purificación fueron realizadas a 4 °C (Saugar *et al.*, 2005).

3.4.3 Purificación de los complejos ribonucleoproteicos (RNPs) de IBDV

La purificación de los complejos ribonucleoproteicos virales (RNPs) se realizó a partir de las partículas virales de IBDV purificadas según se describe en el apartado anterior. Éstas fueron

desensambladas mediante diálisis frente a tampón Tris-EDTA (5 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA) durante 72 h a 21 °C, concentradas en unidades de filtración por centrifugación Amicon-Ultra 0.5 ml (*Merck*) con un límite de 10 kDa, y cargadas en un gradiente discontinuo formado por cuatro fases al 70, 50, 40 y 33% de glicerol en tampón Tris-EDTA. El gradiente fue ultracentrifugado a 40,000 rpm en un rotor SW55 (*Beckman-Coulter Inc.*) (150,000xg) durante 3 h a 21 °C y recolectado en fracciones que fueron dializadas 16 h frente a tampón 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl para los ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) y transfección; o frente a tampón 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 125 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0.01 mM EGTA para los ensayos de actividad RNA polimerasa de IBDV.

Para los análisis por ME y crioEM, las fracciones que contenían menor cantidad de VP2 fueron dializadas 16 h frente a tampón Tris-EDTA, concentradas en unidades de filtración por centrifugación Amicon-Ultra 0.5 ml (*Merck*) con un límite de 10 kDa, y sometidas a un segundo gradiente de glicerol como el descrito anteriormente.

3.4.4 Purificación del complejo VPg-dsRNA en condiciones nativas

La purificación del complejo VPg-dsRNA en condiciones nativas se realizó a partir de las fracciones de RNPs que contenían menor cantidad de VP2, obtenidas según el protocolo descrito en el apartado anterior. Éstas fueron dializadas durante 16 h a 4 °C frente a tampón 50 mM glicina pH 8/9, 0/0.25/0.5/0.75/1 M NaCl, 5 mM EDTA o tampón Na₂CO₃ pH 10/11, 0/0.25/0.5/0.75/1 M NaCl, 5 mM EDTA, concentradas en unidades de filtración por centrifugación Amicon-Ultra 0.5 ml (*Merck*) con un límite de 10 kDa, y cargadas en un gradiente discontinuo formado por cuatro fases al 70, 50, 40 y 33% de glicerol en el mismo tampón. El gradiente fue ultracentrifugado a 45,000 rpm en un rotor SW55 (*Beckman-Coulter Inc.*) (190,000xg) durante 4 h 15 min a 4 °C y recolectado en fracciones que fueron dializadas 16 h frente a tampón 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl para los ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) y transfección; o tampón 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 125 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0.01 mM EGTA para los ensayos de actividad RNA polimerasa de IBDV. Para la purificación del complejo VPg-dsRNA en condiciones desnaturalizantes se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.4.3, excepto que tanto la etapa de desensamblaje como la de ultracentrifugación fueron realizadas en presencia de 0.1% de SDS.

3.4.5 Purificación de dsRNA de IBDV

El material de partida para la purificación de dsRNA viral fueron los viriones de IBDV purificados según el protocolo descrito en el apartado 3.4.2. La muestra fue desnaturalizada en presencia de SDS al 1% durante 3 min a 100 °C y 1 min a 4°C. Posteriormente, fue digerida con proteinasa K a una concentración final de 2 mg/ml durante 2h a 37 °C. Finalmente, el dsRNA

viral fue purificado sucesivamente mediante extracción con TriZol (*Invitrogen*) y adsorción en mini columnas gel de sílice (*Quiagen*), según las instrucciones del fabricante.

3.4.6 Purificación de las proteínas HT-VP1 y HT-VP3

Las proteínas HT-VP1 y HT-VP3 se purificaron a partir de células H5 infectadas con el rBV HT-VP1, o a partir de células BSC-40 infectadas con el rVV HT-VP3, y recogidas a 48 hpi. Las células se lavaron con PBS y fueron resuspendidas en el tampón de lisis 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl y 0.1% IGEPAL CA-360 (*Sigma*) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini; Roche*) o 1 mM PMSF durante 30 min a 4 °C. Posteriormente se sometieron a 3 ciclos de sonicación de 10 s y los extractos fueron centrifugados a 4,000 rpm en un rotor basculante A-4-62 (*Eppendorf*) durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se mezclaron con una resina TALON Metal Affinity (*Clontech*) previamente equilibrada en el tampón de lisis y se incubaron durante 2 h en agitación a 4°C. La muestra se centrifugó durante 5 min a 4,000 rpm y la resina se lavó 3 veces con tampón 50mM Tris-HCl pH 8, 500mM NaCl, 0.1% IGEPAL, 5 mM imidazol. La proteína se eluyó en 4 etapas consecutivas con imidazol 200 mM, 250 mM, 300 mM y 350 mM en el mismo tampón. Las muestras se dializaron durante 16 h frente a tampón 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl para los ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) y transfección; o tampón 100 mM Tris-HCl pH 8.5, 125 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0.01 mM EGTA para los ensayos de actividad RNA polimerasa de IBDV.

3.5 Análisis bioquímico

3.5.1 Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Para la resolución electroforética de proteínas se siguió el método de Laemmli (Laemmli, 1970) de electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Las muestras analizadas fueron mezcladas con tampón de desnaturalización 5X (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 0.06% azul de bromofenol, 25% glicerol y 10 mM DTT), hervidas 3 min a 100 °C, enfriadas 1 min a 4 °C y cargadas en geles de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 37.5:1) al 11%. Posteriormente, dichos geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa o teñidos con azul de Coomassie preparado al 2% (p/v) en una solución al 10% de metanol y 10% de ácido acético. Para el análisis de ácidos nucleicos, los geles teñidos previamente con azul de Coomassie fueron posteriormente teñidos con una solución de bromuro de etidio (BrEt) 0.5 µg/ml y lavados tres veces en agua durante 10 min.

Alternativamente, para el análisis de bandas de alto peso molecular (VPg-dsRNA), las muestras desnaturalizadas fueron cargadas en geles discontinuos de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 50:1) al 6-11%. Previamente a la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa, los geles fueron lavados tres veces con 20 mM NaCl para eliminar el SDS

(inhibidor de enzimas) e incubados con 100 µg/ml RNasa A (*Thermo Scientific*) a 37 °C durante 1 h (a 20 mM NaCl la RNasa A únicamente degrada dsRNA).

3.5.2 Análisis electroforético en geles nativos de agarosa

Para la resolución electroforética de ácidos nucleicos, complejos RNA-proteína y viriones en condiciones nativas, las muestras fueron mezcladas con tampón de carga azul 6X (0.25% azul de bromofenol, 30% glicerol) y cargadas en geles de agarosa al 0,7 % en tampón TBE (90 mM Tris-HCl pH 8, 90 mM ácido bórico, 20 mM EDTA). Tras el proceso de electroforesis, los geles fueron teñidos durante 30 min en una solución de BrEt 0.5 µg/ml y lavados tres veces en agua durante 10 min.

3.5.3 Análisis electroforético en geles desnaturalizantes de agarosa

Para la resolución electroforética de ácidos nucleicos, complejos RNA-proteína y viriones en condiciones desnaturalizantes, se siguió el protocolo descrito en el apartado anterior en tampón TBE suplementado con 0.1 % SDS.

3.5.4 Electrotransferencia e inmunodetección (Western blot)

Una vez llevado a cabo el análisis por SDS-PAGE, las proteínas fueron electrotransferidas en condiciones semisecas durante 60 min a 200 mA a membranas de nitrocelulosa (*Protran, Schleicher & Schuell*) tras incubar durante 5 min el gel y las membranas en tampón Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.0375 % (p/v), metanol 20 % (v/v). En los geles mixtos al 6-11%, las proteínas fueron electrotransferidas en condiciones húmedas durante 2h 15 min a 200 mA. Las membranas fueron saturadas en solución de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en tampón PBS), durante 30 min a 20 °C y posteriormente incubadas con el anticuerpo primario α -VP1, α -VP2, α -VP3 ó α -VP4 diluidos 1:1,000 en solución de bloqueo durante 1 h 30 min a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 min con PBS, se incubaron 45 min a 20 °C con un anticuerpo secundario de cabra α -IgG de conejo conjugado con peroxidasa (*GE Healthcare*) diluido 1:10,000 en solución de bloqueo. La membrana se lavó 3 veces con PBS durante 5 min y se reveló mediante la utilización del sistema comercial quimioluminiscente ECL (*GE Healthcare*) o mediante la adición de 4-cloro-1-naftol en presencia de 0.025 % de H₂O₂.

3.5.5 Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína total en las purificaciones de HT-VP1 y HT-VP3 a partir de baculovirus o virus vaccinia recombinantes respectivamente, fue determinada mediante el

método comercial BCA (*Pierce*) y utilizando como patrón seroalbúmina bovina (BSA), así como mediante la medición de absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). También se estimó la cantidad de proteína purificada analizando simultáneamente las muestras con patrones de BSA, de concentración conocida, mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. Los geles fueron digitalizados en un escáner Perfection 3170 (*EPSON*) y se analizaron con el programa informático de análisis cuantitativo Quantity One (*Bio Rad*).

3.5.6 Determinación de la concentración de RNA

La concentración de RNA total en las purificaciones de dsRNA a partir de IBDV (apartado 3.4.2) fue determinada mediante medición de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). La concentración de RNA de los diferentes complejos RNA-proteína fue determinada analizando simultáneamente las muestras con patrones de dsRNA de IBDV, de concentración conocida, mediante geles desnaturalizantes de agarosa que se tiñeron con BrEt. Los geles fueron digitalizados en un transiluminador Gel Doc 2000 (*Bio-Rad*) y se analizaron con el programa informático de análisis cuantitativo Quantity One (*Bio Rad*).

3.5.7 Ensayo de actividad RNA polimerasa de IBDV

La actividad polimerasa de las diferentes muestras (dsRNA purificado, VPg-dsRNA, RNPs y viriones de IBDV) fue determinada según el protocolo previamente descrito (Spies *et al.*, 1987) con ligeras modificaciones. Las reacciones fueron llevadas a cabo en 100 mM Tris-HCl pH: 8.5, 125 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 0.01 mM EGTA, 1 mM ATP, GTP, CTP, 0.02 mM UTP, RNasin 0.5 µl (20 U), 10 µCi [α -32P] UTP. Las muestras fueron incubadas a 40 °C durante 0, 15, 60 y 120 y congeladas a -80 °C. Posteriormente, fueron descongeladas a 37 °C, suplementadas con 1% SDS, hervidas 3 min a 100 °C, enfriadas 1 min a 4 °C y digeridas con 0.2 mg/ml proteinasa K durante 2 h a 37 °C. Finalmente los nucleótidos no incorporados fueron eliminados mediante columnas preempaquetadas de sefarosa MicroSpin S-200 HR (*GE Healthcare*). Los productos de reacción fueron resueltos mediante electroforesis en geles nativos de agarosa (apartado 3.5.2). Los geles fueron secados sobre papel 3MM (*Whatman*) y autoradiografiados entre 16 h y 72 h en una pantalla fosfoluminiscente (*Phosfor Screen, Molecular Dynamics*). A continuación, la pantalla fue digitalizada en un scanner Storm 869 (*Molecular Dynamics*) y la marca radioactiva incorporada fue cuantificada mediante el programa informático de análisis cuantitativo Quantity One (*Bio Rad*).

3.6 Microscopía de fuerzas atómicas

Los análisis de AFM se realizaron en el IMDEA Nanociencia del campus de la UAM, en colaboración con el Dr. Johann Mertens. Las cápsidas fueron adsorbidas sobre una superficie pirolítica de grafito (HOPG) y visualizadas en condiciones fisiológicas usando el método *jumping mode*, que permite un control preciso de la fuerza máxima aplicada sobre la muestra. Se usó un *cantilever* de nitruro de silicio con una constante de fuerza de 0.05 N/m (*Olympus*). Las medidas fueron analizadas usando el programa informático WSxM (Horcas *et al.*, 2007). La posición y orientación de las cápsidas fueron determinadas en imágenes de 128x128 píxeles a fuerza máxima de rastreo (<100 pN). La fuerza aplicada fue calibrada con curvas de fuerza frente a desplazamiento del piezo en el eje Z (FZ) en la superficie HOPG, en regiones cercanas a las cápsidas. Una vez visualizados detalles de cápsidas individuales, se llevaron a cabo medidas de indentación para cuantificar su respuesta elástica. La altura de las cápsidas fue determinada escaneando su perfil. Si las imágenes adquiridas inmediatamente después de la indentación no mostraban evidencia de daño en la partícula, nuevas curvas FZ se obtuvieron sobre la misma partícula. Series de 3 a 5 curvas FZ consecutivas fueron obtenidas en 21-28 partículas (89-131 indentaciones) para cada población de IBDV. En una indentación, la fuerza se mantiene constante a medida que se aproxima la punta del *cantilever* hasta que entra en contacto con la cápsida; después de lo cual la fuerza se incrementa linealmente hasta que el desplazamiento en el eje Z disminuye a ~20 nm, que se corresponde con una compresión / deformación de aproximadamente el doble del grosor de la envuelta viral (9 nm). En el régimen donde la fuerza aplicada inicialmente se incrementa linealmente, el proceso de nanoindentación fue casi completamente reversible, debido a que el regreso del *cantilever* a su posición inicial resultó en una fuerza directamente inversa a la aplicada inicialmente.

Las constantes de elasticidad de los virus y el *cantilever* pueden ser modeladas mediante dos muelles en serie. La constante de elasticidad del *cantilever* fue determinada mediante calibración en el sustrato. A partir de la pendiente de las curvas FZ, la constante de elasticidad de las cápsidas (k_{caps}) puede ser calculada como $k_{caps} = k_c k_{eff} / (k_c - k_{eff})$, donde k_c es la constante de elasticidad del *cantilever* y k_{eff} es la constante de elasticidad efectiva debida a la deformación del *cantilever* y de la envuelta viral. Como control, se corroboró que las constantes de elasticidad en indentaciones sucesivas en una cápsida individual de la población E1 diferían < 10%. La variabilidad en la distribución de cada partícula individual probablemente sea debida a diferencias en la disposición geométrica de las mismas.

En los ensayos de fatiga mecánica de las poblaciones de IBDV, las partículas adsorbidas en la superficie de HOPG fueron sometidas a ciclos consecutivos de fuerza constante máxima de 150 pN.

3.7 Microscopía electrónica

3.7.1 Contrastado de las muestras

3.7.1.1 Tinción negativa

Sobre una gota de 5 μ l de muestra se depositó una rejilla de microscopía electrónica (ME) con carbón-colodión previamente ionizada mediante descarga iónica (K100X, *Emitech*). La rejilla fue incubada 3 min, lavada dos veces en agua, y el exceso de líquido eliminado mediante contacto del borde de la rejilla con papel de filtro grado 1 (*Whatman*). La concentración óptima de los diferentes ensamblados virales analizados fue determinada mediante diluciones seriadas. Las rejillas fueron incubadas sobre una gota de acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 1 min y el exceso de agente de tinción se eliminó por contacto de la rejilla con papel de filtro. Para la visualización de la muestra se empleó un microscopio electrónico JEOL 12000 EXII estabilizado a 100 kV y las imágenes fueron registradas en micrografías electrónicas (*Kodak* SO-163) a una magnificación nominal 40,000x que fueron reveladas (*Kodak*, D-19) durante 8 min a temperatura ambiente.

Alternativamente, para la visualización de la muestra se empleó un microscopio Tecnai G2 FEG 200 (*FEI*) equipado con un anticontaminador, y estabilizado a 200 kV. Las imágenes se registraron a una magnificación nominal 69,444x (2.16 Å/píxel) bajo condiciones de mínima dosis electrónica en una cámara CCD (*Charged Coupled Device*) FEI Eagle 4k.

3.7.1.2 Inmunomarcaje

Sobre una gota de 5 μ l de muestra se depositó una rejilla de ME con carbón-colodión previamente ionizada mediante descarga iónica (K100X, *Emitech*). La rejilla fue incubada 3 min, lavada dos veces en agua, y el exceso de líquido eliminado mediante contacto del borde de la rejilla con papel de filtro grado 1 (*Whatman*). A continuación, la rejilla fue bloqueada con 5% BSA-PBS durante 10 min, incubada con sueros policlonales α -VP1 o α -VP3 (1/100 en 0.1% BSA-PBS) durante 10 min y lavada dos veces en 0.1% BSA-PBS. Partículas de oro coloidal de 5 nm de diámetro conjugadas con un anticuerpo de cabra α -IgG de conejo (1/50 en 0.1% BSA-PBS; *British Biocell International*) fueron incubadas con la rejilla durante 10 min. Por último la rejilla fue lavada dos veces en PBS y seis veces en agua para eliminar las uniones inespecíficas. La rejilla fue sometida a tinción negativa y visualizadas según lo descrito en el apartado anterior.

3.7.2 Criomicroscopía electrónica

Para el análisis por criomicroscopía electrónica (crio-ME), 5 μ l de la muestra fueron depositados sobre una cara de una rejilla de cobre-rodio cubierta con una película de carbón con

agujeros (*Quantifoil* R2/2) previamente lavada con vapores de acetona. Las muestras fueron vitrificadas en etano líquido según los procedimientos previamente establecidos (Castón *et al.*, 2001; Dubochet *et al.*, 1988), quedando incluidas en una capa de hielo vítreo y conservando su estado nativo, en una unidad Leica EM CPC. Las muestras se visualizaron en un microscopio Tecnai G2 FEG 200 (*FEI*) equipado con un anticontaminador, y estabilizado a 200 kV, en el cual fueron cargadas mediante un criobrazo Gatan 626.53P50. Las imágenes se registraron a una magnificación nominal 69,444x (2.16 Å/píxel) bajo condiciones de mínima dosis electrónica en una cámara CCD FEI Eagle 4k.

3.7.3 Criotomografía electrónica

Los análisis mediante criotomografía electrónica (crio-TE) se realizaron en el *Laboratory of Structural Biology Research* (LSBR) del *National Institute of Arthritis y Musculoskeletal y Skin Diseases* (NIAMS) de los *National Institutes of Health* (NIH) en Bethesda (MD, USA), bajo la dirección del Dr. Alasdair C. Steven y en colaboración con el Dr. Juan Fontana Jordán De Urries.

Las muestras fueron mezcladas con oro coloidal de 10 nm de diámetro (*Aurion*), usado como marcador fiducial, y vitrificadas según el protocolo descrito en el apartado anterior. Las muestras se visualizaron en un microscopio Tecnai-12 (*FEI*) estabilizado a 120 kV y equipado con un filtro de energía (GIF 2002, *Gatan*) en modo *zero-loss* con un diámetro de apertura de 20 eV, en el cual fueron cargadas mediante un criobrazo Gatan 626.53P50. Las imágenes se registraron en una cámara CCD de 2048x2048 píxeles (*Gatan*) a una magnificación nominal 53,600x (5.6 Å/píxel) y con un subenfoco de ~ 4 μm , usando el programa SerialEM (Mastronarde, 2005). Las series de inclinación fueron adquiridas en el rango $\pm 70^\circ$ a intervalos de 2° con una dosis total acumulada de ~ 75 e/Å² por serie.

3.7.4 Procesamiento digital de especímenes sin simetría

Las operaciones generales de procesamiento de imagen fueron llevadas a cabo mediante los paquetes de procesamiento Xmipp [<http://xmipp.cnb.csic.es/>, (de la Rosa-Trevín *et al.*, 2013; Scheres *et al.*, 2008)], Spider [http://spider.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/sites.html], (Frank *et al.*, 1996)], Bsoft [<http://lsbr.niams.nih.gov/bsoft/>], (Heymann y Belnap, 2007)], EMAN (Ludtke *et al.*, 1999), EMAN2 (Tang *et al.*, 2007) y RELION (Scheres, 2012a). Las representaciones gráficas fueron generadas con el programa Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>], (Pettersen *et al.*, 2004)].

El grado de desenfoque de cada micrografía fue calculado analizando su transformada de Fourier promedio mediante los programas ctfind3 (Mindell y Grigorieff, 2003) y Bshow (perteneciente al paquete Bsoft). Para las micrografías analizadas, se determinó que el rango de

desenfoque estaba comprendido entre 1.2 y 4.7 μm en el caso de las imágenes de VP1 y 0.6 y 5.2 μm para las de extremos de RNPs. Dicha información fue empleada para invertir las fases de cada imagen entre las frecuencias adecuadas de la función de transferencia de contraste (CTF).

Las imágenes de las partículas fueron seleccionadas manualmente, extraídas y normalizadas mediante el programa Xmipp. Se seleccionaron 113,433 imágenes de VP1 y 17,687 de los extremos de RNPs. Las imágenes fueron submuestreadas a 6.48 Å/píxel para una mayor eficiencia computacional, y clasificadas bidimensionalmente siguiendo distintas rutinas del paquete Xmipp (Figura 10):

ML2D (*Maximum Likelihood 2D*): clasificación bidimensional basada en máxima verosimilitud (Scheres *et al.*, 2005).

CL2D (*Clustering 2D*): clasificación bidimensional basada en el agrupamiento de las partículas (Sorzano *et al.*, 2010).

KerDenSOM (*Kernel Density estimator Self-Organizing Map*): clasificación bidimensional basada en redes neuronales auto-organizativas (Pascual-Montano *et al.*, 2001).

Tras evaluar las imágenes promedio obtenidas mediante cada una de estas aproximaciones, las clases bidimensionales fueron seleccionadas a partir de los resultados obtenidos con la rutina CL2D e incluyeron un total de 40,000 imágenes de VP1, 10,747 de extremos con una molécula de VP1 y 4,139 de extremos con dos moléculas de VP1.

La obtención de volúmenes iniciales puede llevarse a cabo siguiendo diferentes protocolos en paralelo (Figura 10): método de líneas comunes, media alzada a partir de una clase promedio, blob gaussiano, ruido gaussiano o estructura cristalográfica filtrada. La orientación y centrado inicial de las partículas fue determinada mediante la rutina de *Refine* de EMAN, debido su capacidad de minimizar la dependencia respecto del modelo inicial en la generación de volúmenes. Se evaluaron los modelos iniciales anteriormente descritos y cuando sus refinamientos convergieron en mapas de densidad estable y aspecto similar entre sí, se utilizó uno de ellos (el obtenido a partir de ruido) como modelo para un refinamiento angular iterativo de los ángulos de orientación y centros de las partículas con la rutina *Projection Matching* (Scheres *et al.*, 2008) de Xmipp (Figura 10). Este refinamiento comienza con la proyección del modelo tridimensional inicial, generando un determinado número de proyecciones que se usan como referencias iniciales (referencias teóricas) y se comparan con todas las partículas seleccionadas y extraídas de las micrografías (referencias experimentales). De esta manera, se realiza una clasificación bidimensional en la que cada referencia experimental es asignada a una proyección teórica con un determinado ángulo de proyección. Finalmente las referencias experimentales derivadas de las teóricas se retro-proyectan en el espacio de Fourier y se obtiene un nuevo modelo que se emplea como volumen de referencia para la siguiente iteración. El proceso se repite de forma iterativa hasta que no se observan cambios significativos entre sucesivas iteraciones (Figura 10).

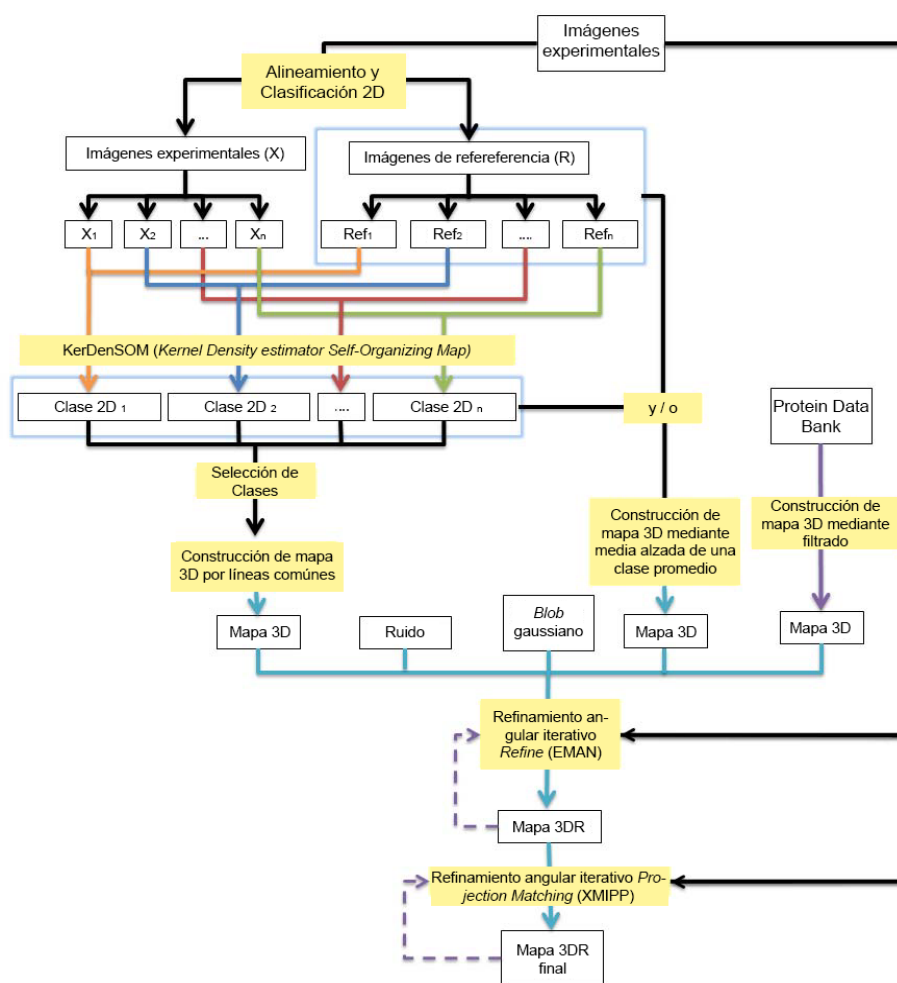


Figura 10. Protocolo de reconstrucción tridimensional a partir de partículas individuales. A partir de las imágenes experimentales, se aplican diferentes métodos de clasificación y alineamiento (ML2D, CL2D, KerDenSOM) con el objetivo de obtener diferentes clases promediadas de varias proyecciones o vistas. Tras la selección de clases de interés, el modelo inicial puede construirse por el método de líneas comunes, a partir de ruido gaussiano, media alzada a partir de una clase promediada, filtrado de estructuras atómicas o a partir de un blob gaussiano. Las 3DRs finales se generaron siguiendo los protocolos de refinamiento angular iterativo de EMAN (Ludtke *et al.*, 1999) y Xmipp (de la Rosa-Trevín *et al.*, 2013; Scheres *et al.*, 2008) consecutivamente.

Para estimar la resolución de los mapas se calculó la función FSC (*Fourier Shell Correlation*) (van Heel, 1984) entre dos mapas independientes que contienen cada uno la mitad de las partículas totales empleadas en cada reconstrucción final. La resolución de cada reconstrucción fue determinada como el recíproco de la frecuencia espacial donde el coeficiente de correlación es 0.5 (criterio FSC = 0.5). Las resoluciones calculadas para VP1, los extremos con una molécula de VP1 y los extremos con dos moléculas de VP1 fueron de 16.0, 25.6 y 30.2 Å, respectivamente.

El ajuste del modelo atómico como un cuerpo rígido en cada uno de los mapas de densidad obtenidos se realizó con el programa Chimera.

3.7.5 Procesamiento digital de especímenes con simetría helicoidal

El procesamiento de las muestras con simetría helicoidal se realizó en colaboración con el Dr. Jaime Martín-Benito Romero (CNB-CSIC). Las imágenes de las partículas fueron seleccionadas manualmente mediante la rutina de picado de Xmipp seleccionando segmentos de RNPs solapantes entre sí y, posteriormente, extraídas y normalizadas. La determinación del rango de desenfoque y el cálculo de la CTF se realizaron siguiendo lo descrito en el apartado anterior. Para las micrografías analizadas, se determinó que el rango de desenfoque estaba comprendido entre 0.6 y 5.2 μm . Se seleccionaron un total de 19,826 imágenes de RNPs. Las imágenes fueron submuestreadas a 4.32 Å/píxel para una mayor eficiencia computacional. Las imágenes fueron clasificadas utilizando la rutina CL2D del paquete Xmipp explicada en el apartado anterior.

El paquete de programas IHRSR (*iterative helical real space reconstruction*) fue usado para generar las reconstrucciones tridimensionales (Egelman, 2000). En este procedimiento, un volumen de referencia o modelo inicial es proyectado para obtener una serie de proyecciones de referencia cuya diferencia radica en sus ángulos de rotación sobre el eje azimutal. A partir de imágenes de los filamentos helicoidales se generan segmentos parcialmente solapantes, y mediante la búsqueda de orientaciones y orígenes son asignados a una de las proyecciones de referencia. El origen y orientación determinados en este proceso son usados para generar una 3DR asimétrica. A partir de este mapa, los parámetros de simetría helicoidal de elevación axial (o traslación en el eje h) y ángulo de rotación estimados previamente mediante el análisis de los filamentos son refinados mediante la rutina *Projection Matching* de Xmipp e impuestos al mismo para generar una 3DR con simetría helicoidal. El modelo resultante se usa como modelo inicial en la siguiente iteración. Tras el refinamiento iterativo, los parámetros de simetría helicoidal convergen en una solución estable que definen las características generales de la hélice. Como modelo inicial se usó un volumen cilíndrico con las dimensiones de los filamentos de RNPs generado con Xmipp, y mediante la imposición de distintos parámetros de simetría helicoidal en función del análisis de las imágenes medias bidimensionales originales, los resultados no convergieron a una solución estable en ninguno de los casos.

3.7.6 Procesamiento digital de especímenes con simetría icosaédrica

Las imágenes de las partículas fueron seleccionadas manualmente mediante la rutina de picado de Xmipp y, posteriormente, extraídas y normalizadas. La determinación del rango de desenfoque y la corrección de la CTF se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.7.4. Para las micrografías analizadas, se determinó que el rango de desenfoque estaba comprendido entre 0.7 y 5.6 μm . Se seleccionaron un total de 5,565 imágenes de partículas con una región central de baja intensidad y con un engrosamiento irregular de la envuelta viral,

denominadas cápsidas E1-1 y 6,565 imágenes de partículas homogéneamente oscuras, denominadas cápsidas E1-2. Las imágenes fueron submuestreadas a 4.32 Å/píxel para una mayor eficiencia computacional.

Las imágenes fueron analizadas mediante la rutina de clasificación 3D del paquete RELION, que realiza una clasificación multireferencia basada en máxima verosimilitud (apartado 3.7.4) implementada con métodos Bayesianos y heurísticos. Las estructuras son refinadas de manera iterativa mediante dos pasos: (1) Expectación o alineamiento, en el que las proyecciones de la estructura son comparadas con las imágenes experimentales proporcionando información sobre la orientación de dichas imágenes. Las orientaciones no son asignadas de manera discreta, si no que se calculan distribuciones de probabilidad de todas las posibles asignaciones. (2) Maximización o reconstrucción suave, en el que las imágenes experimentales son combinadas con la información previa para generar una 3DR. La nueva estructura y las nuevas estimaciones señal-ruido son empleadas para las siguientes iteraciones, hasta que se obtiene una estructura estable. El principal avance de esta implementación sobre los algoritmos clásicos es la minimización de la dependencia del usuario en la determinación e imposición de parámetros y la obtención de datos más objetivos (Scheres, 2012b).

Como modelo inicial para la clasificación 3D se utilizó el mapa tridimensional de la cápsida de IBDV obtenido previamente en nuestro laboratorio (Saugar *et al.*, 2005), escalado adecuadamente y filtrado a 35 Å de resolución. Se realizó una clasificación 3D de cada conjunto de partículas por separado y se obtuvieron dos clases mayoritarias de cápsidas T=13 para cada conjunto de partículas. A continuación, las cuatro clases de partículas fueron evaluadas mediante una clasificación 2D para confirmar su asignación como E1-1 o E1-2 mediante la inspección visual de las imágenes promedio generadas. Los dos nuevos grupos de partículas E1-1 y E1-2 fueron evaluados mediante una nueva clasificación 3D que resultó en dos 3DRs para las partículas E1-1 y otros dos mapas para las partículas E1-2. El nivel de organización de la capa de densidad subyacente a la cápsida T=13 fue distinto en las dos 3DRs de las partículas E1-1 (denominadas E1-1A, que incluye 2,095 partículas, y E1-1B, que incluye 2,027 partículas). Sin embargo, los mapas derivados de las partículas E1-2 son indistinguibles respecto a su contenido interno, por lo que se combinaron en un único mapa con 2,377 partículas. Las 3DRs fueron calculadas usando métodos de Fourier-Bessel (Crowther *et al.*, 1970; Fuller *et al.*, 1996) e imponiendo simetría icosaédrica en los mapas de densidad finales. Para estimar la resolución de los mapas se calculó la función FSC según lo explicado en el apartado 3.7.4. Las resoluciones calculadas para las cápsidas E1-1A, E1-1B y E1-2 fueron de 29.4, 23.6 y 24.4 Å (a 0.5) y 28.2, 20.6 y 23.8 Å (a 0.3), respectivamente.

Los perfiles de densidad radial promedio de las cápsidas E1 de IBDV se calcularon con el paquete Xmipp, y fueron normalizados y escalados adecuadamente. La subunidad asimétrica de IBDV fue ajustada como un cuerpo rígido en el mapa de densidad de cada cápsida utilizando

Chimera, y mediante simetrización se generaron máscaras para la sustracción del volumen interno de los mapas.

3.7.7 Procesamiento digital de series de inclinación y promediado subtomográfico

El procesamiento inicial y el alineamiento de las series de inclinación fueron llevados a cabo mediante el paquete IMOD (Kremer *et al.*, 1996). Se reconstruyeron un total de 11, 10, 3, 4, 10 y 8 tomogramas de las poblaciones E1, E2, E3, E4, E5 y E6, respectivamente, usando algoritmos de retro-proyección (Gilbert, 1972) del paquete IMOD. Partículas individuales de las distintas poblaciones de IBDV fueron seleccionadas manualmente, extraídas de los tomogramas, normalizadas y sometidas a cien iteraciones de filtrado anisotrópico no lineal (Frangakis y Hegerl, 2001) mediante el paquete Bsoft. Se seleccionaron un total de 247, 119, 95, 124, 475 y 457 partículas de las poblaciones E1, E2, E3, E4, E5 y E6, respectivamente.

Las partículas extraídas fueron alineadas y promediadas imponiendo simetría icosaédrica y utilizando como modelo inicial un mapa tridimensional de la cápsida de IBDV obtenido previamente en nuestro laboratorio (Saugar *et al.*, 2005), escalado adecuadamente y filtrado a 35 Å de resolución, mediante la rutina basada en algoritmos de máxima verosimilitud MLTomo (Scheres *et al.*, 2009) del paquete Xmipp. Se calculó un nuevo mapa de densidad que se usó para las subsiguientes etapas de refinamiento iterativo de los ángulos de orientación y centros de las partículas.

Para estimar la resolución de los mapas se calculó la función FSC según lo explicado en el apartado 3.7.4. Las resoluciones calculadas para las cápsidas E1, E2, E3, E4, E5 y E6 fueron de 49.5, 54.3, 53.3, 53.2, 47.2 y 47.8 Å, respectivamente. Los perfiles de densidad radial promedio de las cápsidas E1, E2, E3, E4, E5 y E6 se calcularon con el paquete Xmipp, y fueron normalizados y escalados adecuadamente.

4. Resultados

4.1 Análisis de las poblaciones de IBDV

4.1.1 Caracterización bioquímica de las poblaciones de IBDV

Durante la infección de celulares aviares con IBDV se pueden purificar, mediante ultracentrifugación en gradientes de densidad de CsCl, al menos seis poblaciones virales extracelulares, denominadas E1-E6 (Figura 11A). Las diferentes poblaciones de IBDV purificadas a partir del sobrenadante de células QM7 infectadas con IBDV (moi 1-2pfu/cel) y recogidas a las 72 hpi, fueron analizadas por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie o tinción con BrEt. Mientras que las poblaciones E2-E6 tienen una composición proteica similar (Figura 11B) y están constituidas mayoritariamente por cápsidas T=13, la banda correspondiente a la población E1 presenta cápsidas vacías T=1 y T=13. Las partículas de las poblaciones E2-E6 contienen cantidades constantes de las proteínas pVP2/VP2, VP3 y VP1 (Figura 11B) con 780, ~450 y ~12 copias por cápsida, respectivamente (Luque *et al.*, 2009b). Sin embargo, su contenido genómico es diferente con 1, 2, 3 y 4 segmentos de dsRNA en las poblaciones E2, E3, E4 y E5-E6, respectivamente (Luque *et al.*, 2009a). Estas diferencias son detectables directamente en el mismo gel desnaturalizante mediante tinción con BrEt (Figura 11C).

La poliploidía intrínseca de IBDV permite la generación de partículas virales infectivas con una mayor probabilidad. Aproximadamente el 80% de los viriones producidos en la infección con IBDV está formado por las poblaciones E4-E6, en las que cada partícula puede contener más de un genoma completo (Luque *et al.*, 2009a). Las diferencias entre las poblaciones E5 y E6 no han sido establecidas, cuya infectividad y coeficiente de sedimentación difieren levemente. Las diferencias en las cantidades de oligonucleótidos de cadena sencilla, que representan hasta un 25% del RNA en reovirus purificados (Bellamy y Joklik, 1967), podría explicar el mayor coeficiente de sedimentación en la población E6, así como un distinto comportamiento respecto a la permeabilidad al cesio. Las poblaciones virales E1-E4 pueden dar cuenta de, o bien estadios intermedios del proceso de maduración como sugiere la disminución gradual de la cantidad de pVP2 (Figura 11B), o de cápsidas abortivas durante el ensamblaje (*dead-end products*).

4.1.2 Criotomografía electrónica de las poblaciones virales de IBDV

El material genómico de IBDV está organizado como complejos ribonucleoproteicos (RNPs), estructuras de aspecto filamentoso formadas por el dsRNA viral y las proteínas VP3 y VP1 (Luque *et al.*, 2009b). El dsRNA de las RNPs está recubierto homogéneamente por VP3, mientras que VP1 se encuentra unida covalentemente a los extremos 5' (VPg). Las poblaciones E1-E6 de IBDV fueron vitrificadas por separado y analizadas mediante criotomografía

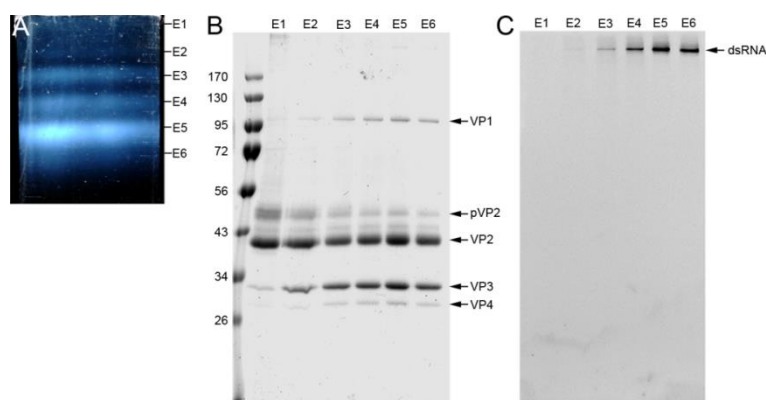


Figura 11. Análisis bioquímico de los componentes estructurales de las poblaciones de IBDV. (A) Gradiente lineal de CsCl iluminado desde la parte inferior del tubo después de la ultracentrifugación de los viriones procedentes de células QM7 infectadas con IBDV y recogidas a las 72 hpi; se observan seis bandas correspondientes a las seis poblaciones (E1-E6) de IBDV. (B, C) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (B) y posteriormente con BrEt (C) de las poblaciones de IBDV. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda en kDa. Las flechas indican (B) las proteínas estructurales VP1, pVP2, VP2, VP3 y VP4 y (C) el dsRNA genómico.

electrónica (crioTE) con el objetivo inicial de caracterizar patrones de organización de los filamentos de RNPs en el interior de la cápsida.

Se reconstruyeron un total de 11, 10, 3, 4, 10 y 8 criotomogramas de las poblaciones E1, E2, E3, E4, E5 y E6, respectivamente. La visualización directa de reconstrucciones tomográficas a partir de imágenes de crioTE (Figura 12) mostró poblaciones de partículas virales con distinto contenido genómico. Así, mientras que el interior de las cápsidas de la población E1 está mayoritariamente vacío (Figura 12A), las cápsidas de la población E5, que contienen cuatro RNPs, muestran una alta densidad distribuida homogéneamente en su interior (Figura 12B).

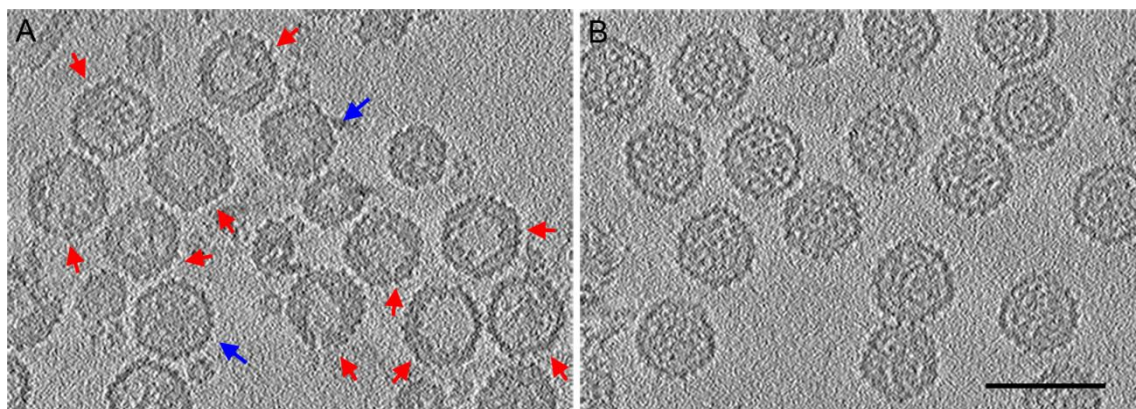


Figura 12. CrioTE de las poblaciones de IBDV. Reconstrucciones tomográficas de partículas de las poblaciones E1 y E5 de IBDV purificadas en gradientes de CsCl. Se muestra la sección central de dos tomogramas representativos de las poblaciones E1 (A) y E5 (B). Las flechas rojas indican las cápsidas E1 vacías y las flechas azules indican las cápsidas E1 con una mayor densidad interna. La barra de escala corresponde a 100 nm.

A partir de los criotomogramas reconstruidos fueron extraídas 247, 119, 95, 124, 475 y 457 partículas individuales de las poblaciones E1, E2, E3, E4, E5 y E6, respectivamente. Las partículas individuales de cada población fueron normalizadas y sometidas a 100 iteraciones de filtrado anisotrópico no lineal (Frangakis y Hegerl, 2001) para facilitar el análisis visual de las mismas. La inspección visual de secciones centrales de reconstrucciones tomográficas de partículas individuales representativas de cada población mostraron un incremento gradual en contenido genómico (Figura 13). Mientras que la densidad interna de las partículas E2-E4 es inferior que la de las partículas E5-E6, el análisis detallado de las partículas E1 mostró unas características estructurales definidas, con una densidad interna similar a la del fondo (es decir, están vacías) y un engrosamiento irregular de la envuelta proteica viral correspondiente a la cápsida. Estas características fueron observadas en la mitad de las partículas analizadas (Figura 13, columnas 3, 4 y 5; Figura 12A, flechas rojas); el resto de las partículas E1, o bien están completamente vacías (14%) o incluyen partículas con una mayor densidad interna (36%) (Figura 12A, flechas azules).

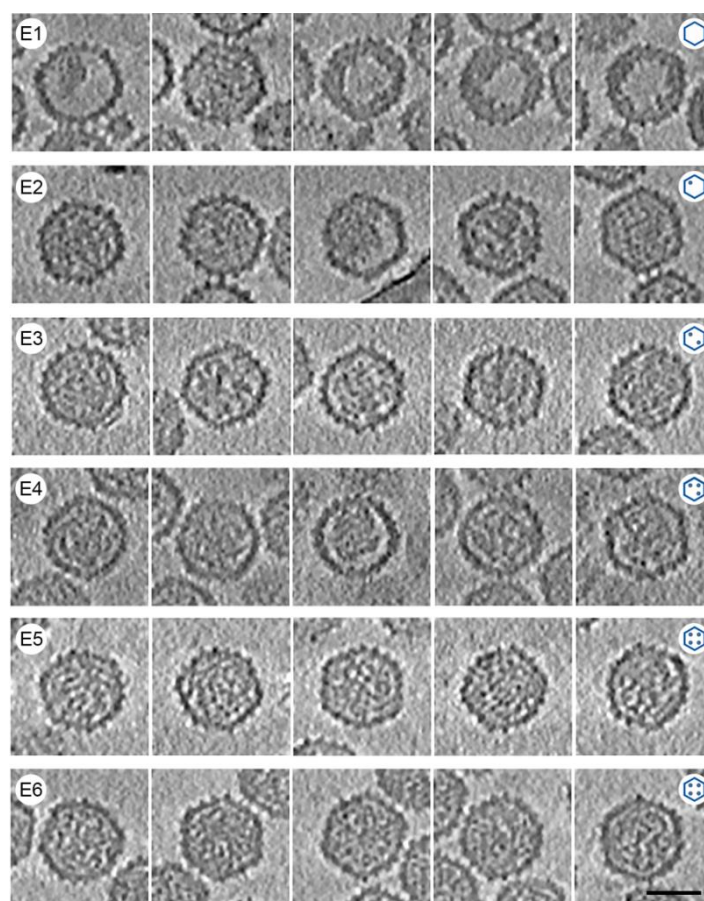


Figura 13. Análisis del contenido genómico de las poblaciones de IBDV por criote. Secciones centrales de reconstrucciones tomográficas de partículas individuales extraídas, normalizadas y filtradas, representativas de las poblaciones E1-E6 de IBDV, en las que se observa un incremento gradual en el contenido genómico, desde cápsidas vacías (E1) a cápsidas con 1 (E2), 2 (E3), 3 (E4) y 4 RNPs (E5 y E6). Los diagramas localizados en la esquina superior derecha representan la cantidad de RNPs (puntos) empaquetadas dentro de las partículas de cada población de IBDV. La barra de escala corresponde a 50 nm.

Debido a la dificultad para identificar las características estructurales de la cápsida y/o de posibles patrones de organización en los filamentos de RNPs, tanto a partir de sus secciones centrales (Figura 13) como de sus volúmenes (no mostrado), las reconstrucciones individuales de cada población fueron alineadas y promediadas respecto a un mapa de la cápsida T=13 de IBDV obtenido previamente en nuestro laboratorio (Saugar *et al.*, 2005), e imponiendo simetría icosaédrica (Figura 14A). Las resoluciones obtenidas mediante el cálculo de la función FSC 0.5 para las poblaciones E1, E2, E3, E4, E5 y E6 fueron de 49.5, 54.3, 53.3, 53.2, 47.2 y 47.8 Å, respectivamente.

La superficie externa de los mapas muestra el número de triangulación T=13 de la cápsida de IBDV (Figura 14A, fila superior). La comparación de las secciones centrales de los mapas de las poblaciones E1-E6 mostró que el contenido interno genómico es más elevado en las poblaciones E2-E6 y, debido al promediado icosaédrico, se observa homogéneamente distribuido en el interior de la cápsida (Figura 14A, fila inferior). Asimismo, el componente genómico está separado de la superficie interna de la cápsida T=13. El mapa tridimensional de la cápsida E1 está constituido por una cápsida T=13 (similar a la de las demás poblaciones virales) que tiene numerosas conexiones con una densidad interna concéntrica; es decir, el engrosamiento observado en los tomogramas se ha resuelto en dos capas concéntricas. El análisis de los perfiles radiales de distribución de densidad de las 3DRs muestra que las cápsidas T=13 de E1-E6 tienen un grosor similar (Figura 14B). La cápsida E1 muestra una menor depresión del anillo de Fresnel interno (correspondiente a un radio de ~250 Å) que da cuenta de las densidades que forman las conexiones referidas anteriormente (Figura 14B, flecha). A diferencia con las poblaciones E2-E6, la densidad interna de E1 se localiza mayoritariamente entre los radios 200-250 Å y la zona central de la cápsida está vacía. (Figura 14B).

En resumen, el análisis por criote no muestra un patrón de organización estructural definido de las RNPs empaquetadas en el interior del virión. Estos resultados demandan una caracterización bioquímica de los componentes estructurales de la población E1, que carece de dsRNA, y que de cuenta de la densidad interna de la cápsida T=13.

4.1.3 Caracterización bioquímica y por microscopía electrónica de la población E1

La población E1 está constituida por partículas heterogéneas, mayoritariamente cápsidas vacías T=13 y T=1 (Figura 15A). Con el objetivo de optimizar las preparaciones de cápsidas T=13, la fracción de E1 obtenida mediante ultracentrifugación en gradientes de CsCl fue sometida a una ultracentrifugación en un gradiente lineal de sacarosa 25-50%. Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, o WB con anticuerpos α -VP2 o α -VP3

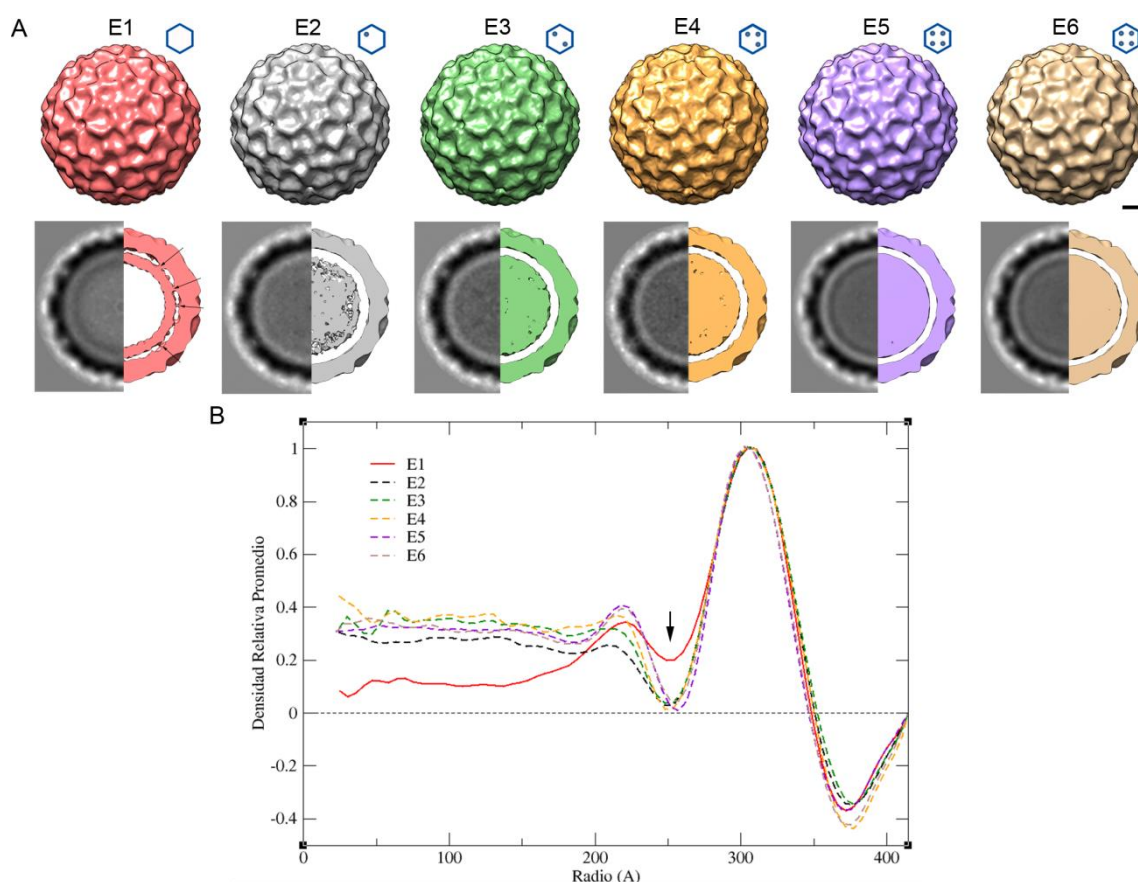


Figura 14. Subtomogramas promediados y 3DRs de las poblaciones de IBDV. (A) Superficie externa de las 3DRs de las poblaciones E1-E6 de IBDV vistas desde un eje de simetría icosaédrica de orden 2 y umbralizadas a 1σ sobre la densidad media (fila superior). Secciones centrales de los mapas de densidad (fila inferior, mitad izquierda) y secciones de 17 Å de grosor umbralizadas a 0.4σ para visualizar el contenido interno de las partículas (fila inferior, mitad derecha). Las flechas en la cápsida E1 indican los puntos de conexión de la cápsida T=13 con la capa adyacente interna. La barra de escala corresponde a 10 nm. (B) Plot de densidad radial de las poblaciones de IBDV E1 (rojo), E2 (negro discontinuo), E3 (verde discontinuo), E4 (naranja discontinuo), E5 (morado discontinuo) y E6 (marrón discontinuo). La flecha indica la localización de las conexiones de la cápsida T=13 con la capa adyacente interna de la población E1. Los diagramas representan la cantidad de RNPs (puntos) de cada población de IBDV (como en la Figura 13).

(Figuras 15B-D), y por microscopía electrónica (ME) y tinción negativa (Figuras 15E-F). Los ensamblados correspondientes a las cápsidas T=13 se distribuyen en la zona central del gradiente, y están constituidas por tres bandas mayoritarias de ~ 52 , ~ 43 y ~ 34 kDa que se corresponden con pVP2, VP2 y VP3 (fracciones 6-8; Figuras 15A, E). Las cápsidas T=1 se distribuyen en la zona superior del gradiente y están constituidas mayoritariamente por VP2 (fracciones 10-12; Figuras 15A, F). La identificación de estas bandas se realizó con sueros específicos α -VP2 y α -VP3. El análisis por WB muestra que la señal correspondiente a pVP2/VP2 es detectada en los dos tipos de estructuras (Figura 15C), pero VP3 sólo fue detectada en las cápsidas T=13 (Figura 15D). Las bandas de pVP2 y VP2 fueron cuantificadas en las fracciones 6-8 a partir de geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie. La intensidad

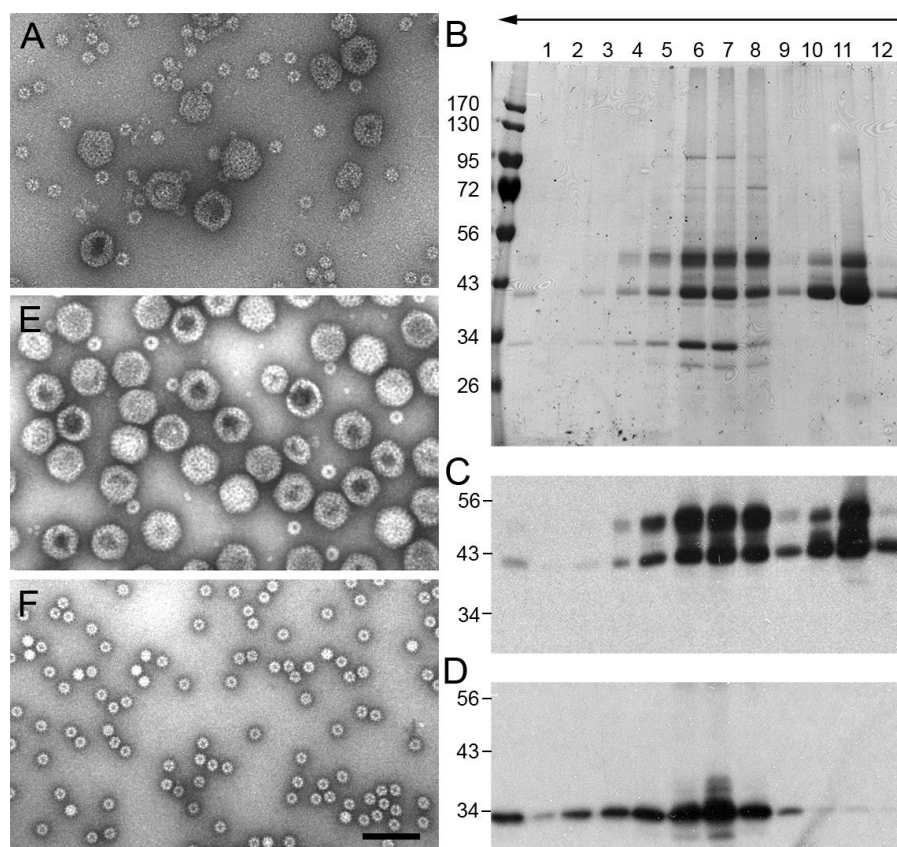


Figura 15. Análisis de las cápsidas de la población E1 de IBDV. Las cápsidas de la población E1 de IBDV fueron sometidas a una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa para separar partículas con distinto tamaño. (A) Análisis por ME y tinción negativa de la población E1 (fracción superior del gradiente de CsCl). (B-D) Análisis mediante (B) SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie, (C) WB con α -VP2, y (D) WB con α -VP3 de las fracciones del gradiente de sacarosa de los ensamblados de la población E1. La flecha superior en el gradiente indica la dirección de sedimentación. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda en kDa. (E-F) Análisis por ME y tinción negativa de (E) fracción 6 y (F) fracción 11 del gradiente de sacarosa mostrado en (B). La barra de escala corresponde a 100 nm.

registrada de cada banda en cada fracción se normalizó en función de su peso molecular y se calculó la relación molar entre ellas. Las cápsidas T=13 (fracciones 6-8) tienen una relación molar pVP2:VP2 de 1:1. Estos resultados indican un procesamiento incompleto en las cápsidas T=13 de la población E1 ya que están ensambladas de forma equimolar a partir de pVP2 y VP2. Además, la capa de densidad adyacente a la superficie interna de la cápsida T=13 está formada por VP3, sugiriendo que VP3 continúa ejerciendo su función de andamiaje, en línea con trabajos previos de nuestro grupo (Luque *et al.*, 2007; Saugar *et al.*, 2010; Saugar *et al.*, 2005). Estos resultados demuestran el papel de proteína de andamiaje de VP3 *in situ*. Por tanto, las cápsidas T=13 de la población E1, aunque sean ensamblados abortivos, representan un estadio intermedio de maduración y ensamblaje de la cápsida de IBDV o, lo que es lo mismo, un estadio próximo a la procápsida de IBDV.

4.1.4 Criomicroscopía tridimensional de cápsidas T=13 de la población E1

La obtención de fracciones enriquecidas en cápsidas T=13 de la población E1 permitió llevar a cabo una caracterización estructural en mayor detalle de la función de andamiaje de VP3 durante el ensamblaje. Las fracciones enriquecidas en cápsidas T=13 fueron vitrificadas y analizadas mediante criomicroscopía electrónica (crioME). La inspección visual de las imágenes de crioME mostró dos poblaciones de cápsidas T=13 diferenciadas en cuanto a su densidad; se diferencian partículas con una región central de baja densidad y con un engrosamiento irregular de la envuelta proteica viral, denominadas cápsidas E1-1 (Figura 16A, flechas rojas), y partículas con una densidad interna más elevada y distribuida homogéneamente, denominadas cápsidas E1-2 (Figura 16A, flechas azules), como se había visualizado previamente en las imágenes de crioTE (Figura 12A).

Se seleccionaron 5,565 partículas E1-1 y 6,565 partículas E1-2 y fueron analizadas mediante una clasificación 3D dentro del paquete de programas de Relion (Scheres, 2012b) utilizando como modelo inicial un mapa de IBDV (Saugar *et al.*, 2005). Como resultado se obtuvieron dos clases mayoritarias de cápsidas T=13 para cada conjunto de partículas. A continuación, las cuatro clases de partículas fueron evaluadas mediante una clasificación 2D para confirmar su asignación como E1-1 o E1-2 mediante la inspección visual de las imágenes promedio generadas. Los dos nuevos grupos de partículas E1-1 y E1-2 fueron evaluados mediante una nueva clasificación 3D que resultó en dos 3DRs para las partículas E1-1 y otros dos mapas para las partículas E1-2.

El análisis de los mapas tridimensionales de la población E1 mostró diferencias significativas en cuanto a la organización de su contenido interno que, teniendo en cuenta los análisis bioquímicos y por crioET de la población E1, se corresponde con la proteína VP3 (Figuras 16B-D). El nivel de organización de la capa de densidad subyacente a la cápsida T=13 es distinto en las dos 3DRs de las partículas E1-1 (denominadas E1-1A, que incluyen 2,095 partículas, y E1-1B, que incluyen 2,027 partículas), debido a las conexiones entre ambas capas proteicas, siendo mucho más numerosas e intensas en la clase E1-1A que en la clase E1-1B (Figuras 16B, C). El análisis de los perfiles radiales de distribución de densidad de las 3DRs confirmó estos resultados (Figura 16E, líneas roja y verde), y el grosor de la capa de VP3 es ~4 nm. Sin embargo, los mapas derivados de las partículas E1-2 son indistinguibles respecto a su contenido interno, por lo que se combinaron en un único mapa con 2,377 partículas (Figura 16D). En el mapa E1-2 la densidad interna tiende a estar homogéneamente distribuida en el volumen interior en lugar de localizarse en una capa definida (Figura 16E, línea azul). Las resoluciones obtenidas para las partículas E1-1A, E1-1B y E1-2 mediante el cálculo de la función FSC fueron de 29.4, 23.6 y 24.4 Å (a 0.5) y 28.2, 20.6 y 23.8 Å (a 0.3), respectivamente (Figura 17).

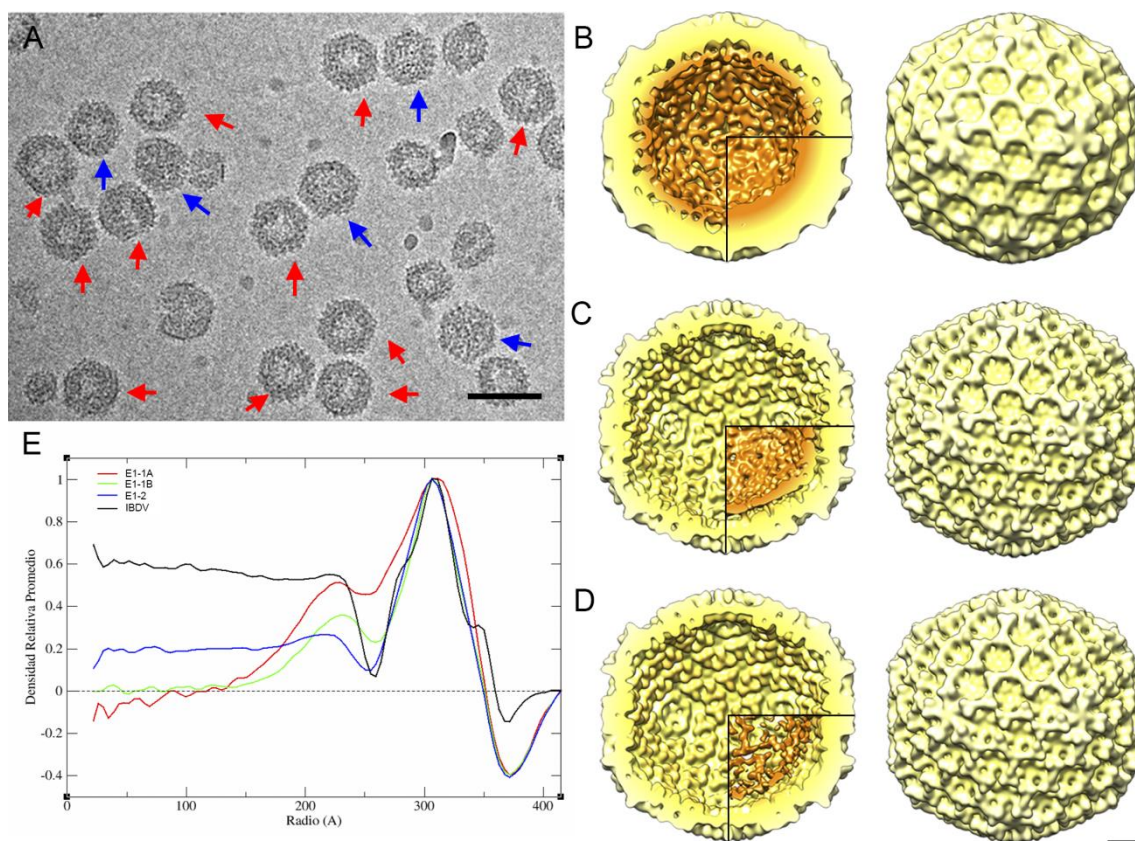


Figura 16. Criome y 3DRs de cápsidas T=13 de la población E1 de IBDV. (A) Criomicrografía electrónica de la población E1 de IBDV enriquecida en cápsidas T=13. Las flechas rojas indican partículas con un aspecto vacío y un engrosamiento de la envuelta proteica viral (cápsidas E1-1) y las flechas azules indican partículas con un aspecto homogéneo (cápsidas E1-2). La barra de escala corresponde a 100 nm. (B, C) 3DRs de las dos clases de cápsidas E1-1 mostrando las superficies interna (izquierda) y externa (derecha), vistas desde un eje de simetría icosaédrica de orden 2, constituidas por (B) cápsidas E1-1A (con numerosas conexiones entre pVP2/VP2 y VP3) y (C) cápsidas E1-1B (con menos conexiones). (D) 3DR de cápsidas E1-2. Las superficies interna y externa se muestran coloreadas radialmente de amarillo a naranja (desde el exterior hacia el interior) y a un umbral de 1.25 σ sobre la densidad media, excepto el cuadrante inferior derecho de las superficies internas que se muestra a un umbral de 0.75 σ . La barra de escala corresponde a 10 nm. (E) Plot de densidad radial de las cápsidas E1-1A (rojo), E1-1B (verde), y E1-2 (azul). Como control se incluye el de viriones de IBDV (negro) (Saugar *et al.*, 2005).

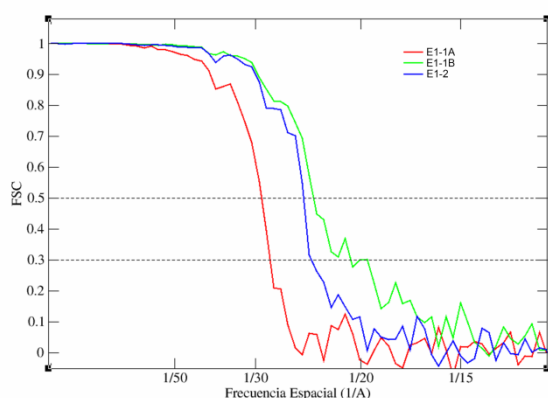


Figura 17. Resolución de las 3DRs de las cápsidas T=13 de la población E1 de IBDV. Determinación de la resolución mediante FSC de las 3DRs de las cápsidas E1-1A (rojo), E1-1B (verde) y E1-2 (azul). Las líneas discontinuas negras representan valores de FSC iguales a 0.5 y 0.3. Los valores de resolución fueron 29.4, 23.6 y 24.4 Å (FSC 0.5) y 28.2, 20.6 y 23.8 Å (FSC 0.3) para las cápsidas E1-1A, E1-1B y E1-2, respectivamente.

Estos resultados indican que las cápsidas de la población E1 están constituidas por, al menos, tres poblaciones diferenciables en cuanto al nivel de organización de la capa de densidad constituida por la proteína VP3. En la clase E1-1A, VP3 se organiza en una capa definida, inmediatamente subyacente a la cápsida T=13, y existen numerosas conexiones entre ambas. En la clase E1-1B, las conexiones entre las capas de pVP2/VP2 y VP3 han disminuido y el nivel de organización de la capa de VP3 es menor. Ambas clases son observadas como cápsidas T=13 con un engrosamiento de la envoltura proteica. Sin embargo, en la clase E1-2 apenas se detectan estas conexiones y la densidad correspondiente a VP3 se observa homogéneamente distribuida en el interior de la cápsida T=13 con una baja densidad.

El análisis de secciones centrales y de las reproyecciones bidimensionales generadas a partir de los mapas E1-1A, E1-1B y E1-2 (filtrados a la misma resolución de ~ 30 Å) mostró estas diferencias en la organización del volumen interno (Figura 18). Para definir los puntos de conexión entre pVP2/VP2 y VP3, se eliminó computacionalmente las densidades internas de las distintas cápsidas T=13. Para ello, se aplicaron máscaras generadas mediante la simetrización de la subunidad asimétrica de la cápsida T=13 (constituida por 13 moléculas de VP2) después de ser ajustada en cada mapa de densidad. Como control interno se realizaron las mismas manipulaciones computacionales sobre el mapa de IBDV usado como modelo inicial. Las reproyecciones bidimensionales de las 3DRs que incluyen únicamente la cápsida T=13 mostraron un aspecto muy similar (Figuras 18E-H). Sin embargo, las reproyecciones bidimensionales de las 3DRs que incluyen la capa de VP3 con distintas organizaciones son equivalentes a las imágenes de crioME originales, con una capa de densidad localizada muy próxima a la cápsida T=13 (correspondiente a las cápsidas E1-1A y E1-1B), o con una distribución homogénea (correspondiente a la cápsida E1-2) (Figuras 18I-L).

El análisis en detalle de la cápsida E1-1A nos permitió determinar las conexiones entre la cara interna de la cápsida T=13 de pVP2/VP2 y la superficie externa de la capa de densidad de VP3 (Figura 19A, rojo). Las zonas de conexión se localizan en el centro de las posiciones pentaméricas y, en mayor medida, en los monómeros de VP2 que constituyen los hexámeros, En particular en ocho subunidades de VP2 (A, B, E, F, G, I, L y M) que conforman la subunidad asimétrica (Figura 19B y Figura 19C, elipse y círculos rojos). Estas conexiones entre pVP2/VP2 y VP3 se detectaron, aunque con mucha menor intensidad, en las cápsidas E1-1B (Figura 19C, círculos verdes discontinuos) y, con menor intensidad aún, en las cápsidas E1-2 (Figura 19C, círculos azules discontinuos). La existencia de siete u ocho conexiones en cada subunidad asimétrica implica 420-480 conexiones/cápsida, un valor consistente con el número medio de moléculas de VP3/virión en las poblaciones E2-E6 (~ 450 copias) determinado a partir de muestras marcadas con Met-S³⁵ (Luque *et al.*, 2009a).

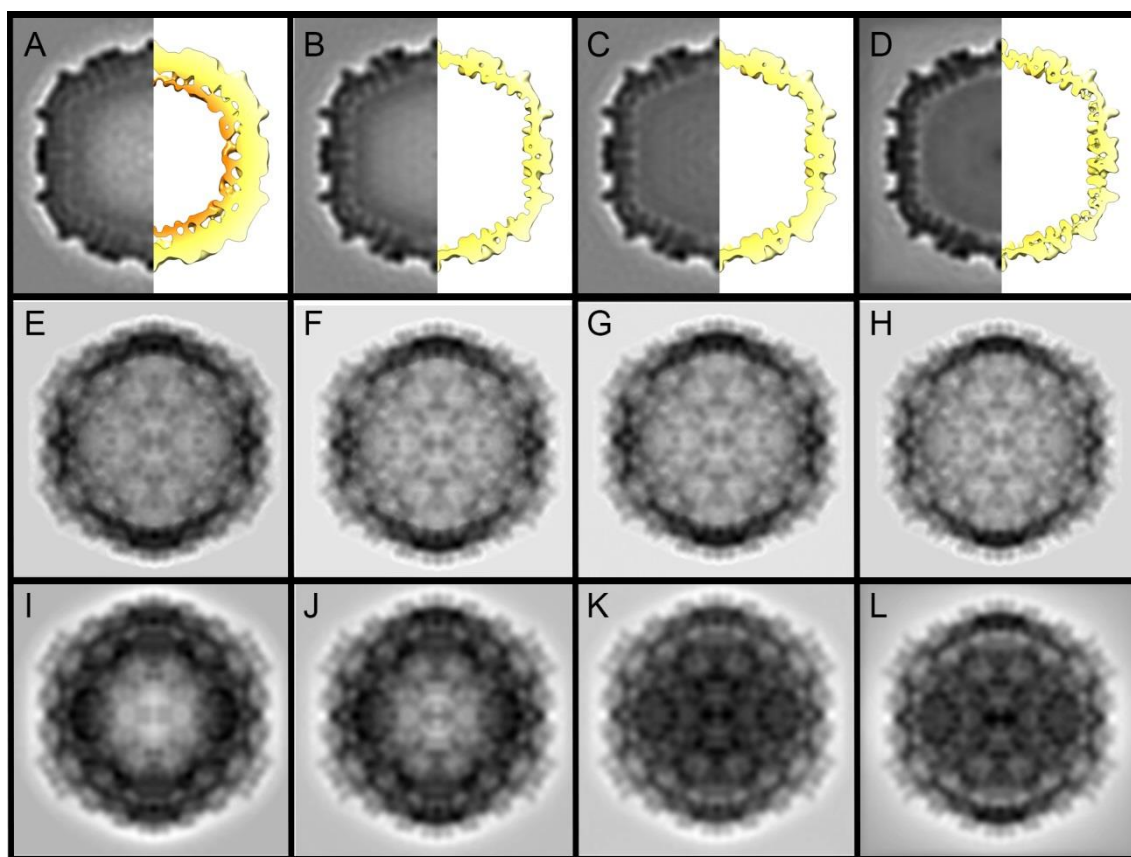


Figura 18. Análisis estructural comparativo de cápsidas T=13 de la población E1 de IBDV. (A-D) Secciones centrales de las 3DRs de las cápsidas (A) E1-1A, (B) E1-1B, (C) E1-2 y (D) viriones de IBDV (Saugar *et al.*, 2005), vistas desde un eje de simetría icosaédrica de orden 2 y filtradas a 30 Å (mitad izquierda) y secciones de 17 Å de grosor umbralizadas a 1.25 σ sobre la densidad media (mitad derecha) (E-L) Reproyecciones bidimensionales de las cápsidas T=13 de (E) E1-1A, (F) E1-1B, (G) E1-2 y (H) viriones de IBDV, filtradas a 30 Å después de eliminar computacionalmente su contenido. (I-L) Reproyecciones bidimensionales de las 3DRs de (I) E1-1A, (J) E1-1B, (K) E1-2 y (L) viriones de IBDV, filtradas a 30 Å.

Los resultados derivados del análisis de las cápsidas T=13 de la población E1 sugieren la existencia de al menos tres estadios de maduración, en función de la organización de VP3 en el interior de la cápsida y de la intensidad de las conexiones entre las capas proteicas de pVP2/VP2 y VP3. Las cápsidas E1-1A, con contactos definidos entre pVP2/VP2 y VP3, representarían un estadio temprano de ensamblaje y maduración de la cápsida en el que VP3 estabiliza o sirve de molde para la cápsida T=13 inestable (con baja resolución) y con una elevada proporción de pVP2. Probablemente la capa de VP3 no adquiere una organización icosaédrica. Las cápsidas E1-1B y E1-2 representarían los siguientes estadios donde VP3 apenas está interaccionando con la cápsida T=13. El hecho de que la densidad de VP3 en la cápsida E1-1B se localice en una región claramente delimitada sugiere que, en este estadio, VP3 mantiene interacciones dinámicas con la cápsida T=13, mientras que en la cápsida E1-2, VP3 se dispone “libre” en el volumen interior de la cápsida.

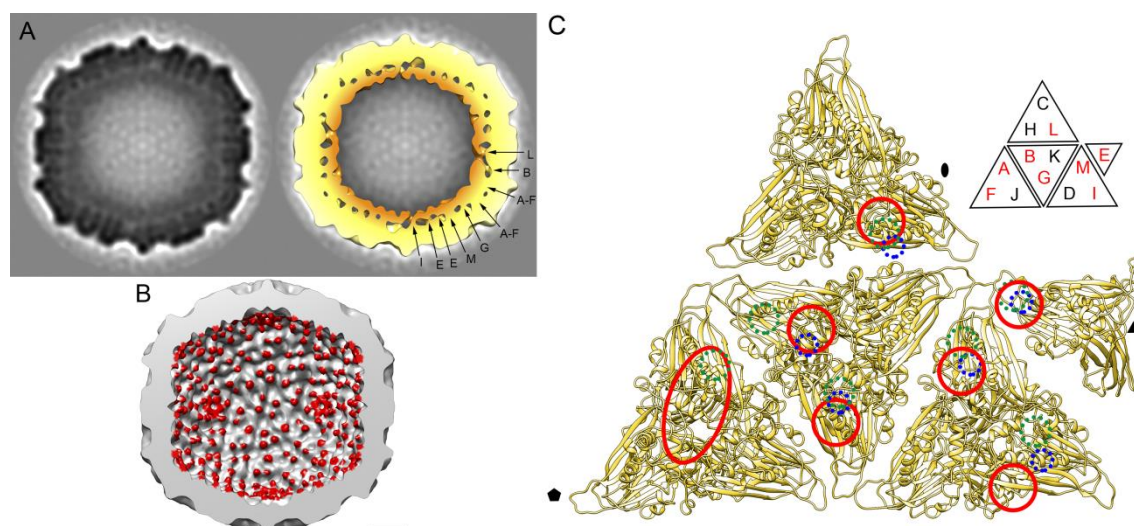


Figura 19. Análisis de las conexiones entre pVP2/VP2 y VP3. (A) Estructura tridimensional de la cápsida E1-1A. Sección central, vista desde un eje de simetría icosaédrica de orden 2 (izquierda), y sección de 17 Å de grosor, umbralizada a 1.25σ sobre la densidad media (derecha), donde se muestran los puntos de conexión entre la cápsida T=13 y la capa interna de VP3. Las flechas indican los contactos de la capa interna de VP3 con las subunidades de VP2 que conforman la subunidad asimétrica de la cápsida T=13. (B) Superficie interna de la cápsida T=13 donde se indican las conexiones entre pVP2/VP2 y VP3 (rojo). La barra de escala corresponde a 10 nm. (C) Localización de las conexiones en la cápsida E1-1A entre VP3 y las subunidades de VP2 que conforman la unidad asimétrica de la cápsida T=13 de IBDV (círculos y elipse rojos). También se indican los vestigios de las conexiones en las cápsidas E1-1B (círculo discontinuo verde) y E1-2 (círculo discontinuo azul). Se muestra un esquema de la unidad asimétrica (A-L) donde se indica las subunidades que interaccionan con VP3 (rojo) (esquina superior derecha).

4.2 Análisis de la funcionalidad de las RNPs de IBDV

4.2.1 Obtención y purificación del complejo VPg-dsRNA en condiciones nativas

La proteína VP3 se encuentra homogéneamente unida de manera no covalente a lo largo de la doble hélice del dsRNA genómico formando RNPs. La diálisis de viriones de IBDV frente a un tampón de baja fuerza iónica y a pH básico (tampón Tris-EDTA: 5 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA) conlleva la ruptura o desensamblaje de la cápsida viral y la liberación del contenido genómico en forma de RNPs, sin comprometer la actividad de síntesis de RNA de la polimerasa viral VP1/VPg asociada a las RNPs (Luque *et al.*, 2009b). Como continuación de estos análisis, nos propusimos caracterizar el papel VP3 en la funcionalidad de las RNPs, por lo que nos planteamos la extracción de VP3 en condiciones nativas. La purificación de RNPs se realizó mediante ultracentrifugación en gradientes discontinuos de glicerol, y se analizó en geles de agarosa en presencia de 0.1% SDS teñidos con BrEt y en geles SDS-PAGE y WB con anticuerpos α -VP3 (Figura 20A). La obtención de RNPs desprovistas de VP3, denominado complejo VPg-dsRNA, se había realizado previamente en condiciones desnaturizantes mediante diálisis de IBDV frente a tampón Tris-EDTA en presencia de 0.1% SDS (Figura 20B). A diferencia de las RNPs o el propio virus, este complejo VPg-dsRNA es inactivo en ensayos

de actividad de síntesis de RNA en presencia de [32 P]-UTP, al igual que dsRNA purificado de IBVD (sin VP1/VPg) (Luque *et al.*, 2009b).

Para la obtención del complejo VPg-dsRNA en condiciones nativas, RNPs purificadas fueron dializadas frente a tampones con distintos pH: 50 mM glicina pH 8, 1 M NaCl, 5 mM EDTA (Figura 20C); 50 mM glicina pH 9, 1 M NaCl, 5 mM EDTA (Figura 20D); 50 mM Na₂CO₃ pH 10, 5 mM EDTA, 1 M NaCl (Figura 20E); y 50 mM Na₂CO₃ pH 11, 5 mM EDTA, 1 M NaCl (Figura 20F). Asimismo, las RNPs purificadas fueron dializadas frente al tampón 50 mM Na₂CO₃ pH 10, 5 mM EDTA con distintas concentraciones salinas: 0 M NaCl (Figura 20G), 0.25 M NaCl (Figura 20H), 0.5 M NaCl (Figura 20I) y 0.75 M NaCl (Figura 20J). La diálisis frente al tampón 50 mM Na₂CO₃, 5 mM EDTA, 1 M NaCl pH 10/11 fue seleccionada para la purificación del complejo VPg-dsRNA (Figura 20E), ya que es el método más suave y reproducible que favorece la separación más eficiente de VP3 (detectada en las fracciones superiores del gradiente de glicerol, fracciones 17-20) del complejo VPg-dsRNA (fracciones 9-15). El análisis mediante electroforesis en geles de agarosa (en presencia de 0.1% SDS) mostró una movilidad electroforética similar del complejo VPg-dsRNA y de las RNPs (Figura 20K, carriles 2 y 3), con un ligero retardo en relación al dsRNA viral purificado (Figura 20K, carril 1).

Las fracciones del gradiente de glicerol fueron analizados mediante SDS-PAGE en geles discontinuos 6-11% y WB con anticuerpos α -VP1 (Figura 20L). Los geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa directamente (Figura 20L, arriba), o tratados previamente con RNasa A para degradar el dsRNA y favorecer la transferencia de VPg (Figura 20L, centro). Asimismo, se hizo un seguimiento de la presencia de VP1 en todas las fracciones del gradiente (Figura 20L, abajo). Mientras que VPg (con una limitada movilidad electroforética; ver Figura 11C) comigra con el dsRNA (fracciones 13-15), VP1 se encuentra en las fracciones superiores del gradiente, incluyendo las fracciones 13-15, lo que indica la presencia de VP1 y VPg en los complejos purificados de VPg-dsRNA. Por tanto, los complejos VPg-dsRNA han sido desprovistos de la mayor parte de su contenido en VP3, pero contienen una cantidad significativa de VP1.

4.2.2 Caracterización bioquímica y funcional del complejo VPg-dsRNA

Los complejos VPg-dsRNA obtenidos en condiciones nativas mediante diálisis de RNPs frente al tampón 50 mM Na₂CO₃ pH 10, 1 M NaCl, 5 mM EDTA o frente a tampón 50 mM Na₂CO₃ pH 11, 1 M NaCl, 5 mM EDTA fueron reconstituidos con VP3. Para ello se llevó a cabo la

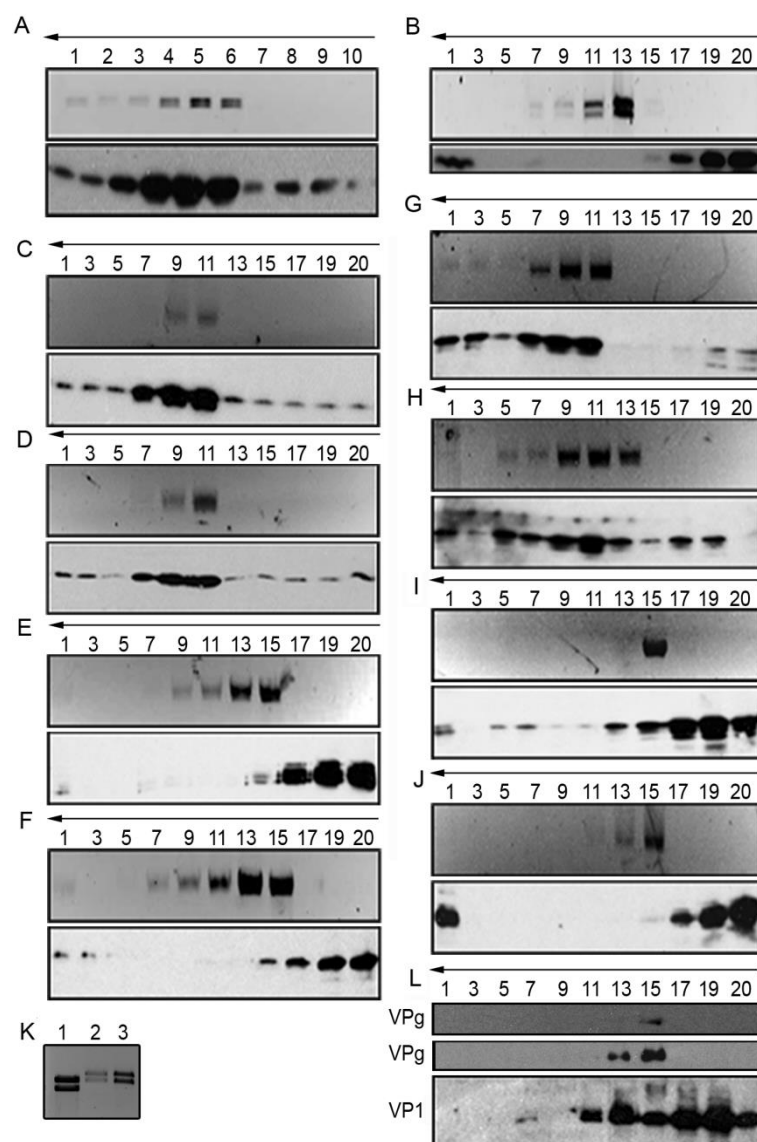


Figura 20. Determinación de las condiciones óptimas para la purificación de complejos nativos de VPg-dsRNA. (A) Análisis mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con BrEt (arriba) o SDS-PAGE y WB con anticuerpos α -VP3 (abajo) de las fracciones (1-20) de los gradientes discontinuos de glicerol correspondientes a la purificación de RNPs. (B) Análisis equivalente correspondiente a la purificación de VPg-dsRNA en condiciones desnaturalizantes. (C-F) Análisis equivalente de RNPs sometidas a diálisis frente a tampones conteniendo 5 mM EDTA y 1 M NaCl a (C) pH 8, (D) pH 9, (E) pH 10 y (F) pH 11, para obtener complejos nativos de VPg-dsRNA. (G-J) Análisis equivalente de RNPs sometidas a diálisis frente al tampón 50 mM Na_2CO_3 pH 10, 5 mM EDTA y concentraciones salinas de (G) 0 M, (H) 0.25 M, (I) 0.5 M y (J) 0.75 M NaCl, para obtener complejos nativos de VPg-dsRNA. (K) Análisis en geles de agarosa desnaturalizantes y tinción con BrEt de (1) dsRNA de IBVDV, (2) RNPs, y (3) VPg-dsRNA obtenido en condiciones nativas 50 mM Na_2CO_3 pH 10, 1 M NaCl, 5 mM EDTA (como en E). (L) Análisis mediante SDS-PAGE (6-11%) y WB con anticuerpos α -VP1 de las fracciones (1-20) de los gradientes discontinuos de glicerol correspondientes a la purificación de VPg-dsRNA (como en E). Para la detección de VPg, la transferencia se hizo directamente (arriba), o después de incubar el gel con RNasa A (centro). La detección de VP1 se realizó a partir de geles SDS-PAGE al 11% y WB con anticuerpos α -VP1 (abajo). La flecha superior indica la dirección de sedimentación.

titulación de VPg-dsRNA con HT-VP3 (Ferrero *et al.*, 2015a; Garriga *et al.*, 2007), previamente purificada mediante cromatografía de afinidad (apartado 3.4.6) a partir de células BSC-40

infectadas con el rVV HT-VP3 (moi 2-5 pfu/cel) y recogidas a las 48 hpi (Figura 21, carril 1). La unión de HT-VP3 al complejo VPg-dsRNA se determinó mediante ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) en geles nativos de agarosa.

El número medio de moléculas de VP3/virión que presentan las poblaciones E2-E6 de IBDV es de ~450 copias (Luque *et al.*, 2009a) que, en el caso de las poblaciones mayoritarias que contienen cuatro segmentos (E5-E6), equivale a ~112 moléculas de VP3 por segmento de dsRNA. A partir de esta estimación, los complejos VPg-dsRNA nativos fueron incubados durante 30 min a 21 °C con HT-VP3 en relaciones molares dsRNA:HT-VP3 de 1:125, 1:250 y 1:500. Los productos resultantes fueron analizados mediante EMSA en geles nativos de agarosa y tinción con BrEt o WB con anticuerpos α -VP3 (Figuras 21A, B). Los complejos VPg-dsRNA obtenidos tras diálisis a pH 10 (Figura 21, carril 1) o pH 11 (Figura 21, carril 7) son reconstituidos gradualmente tras incubación con cantidades crecientes de VP3 (Figura 21, carriles 3-5, y carriles 8-10), y muestran una movilidad electroforética similar a la de las RNPs (Figura 21, carril 6) después de la incubación con VP3 a una relación molar 1:500.

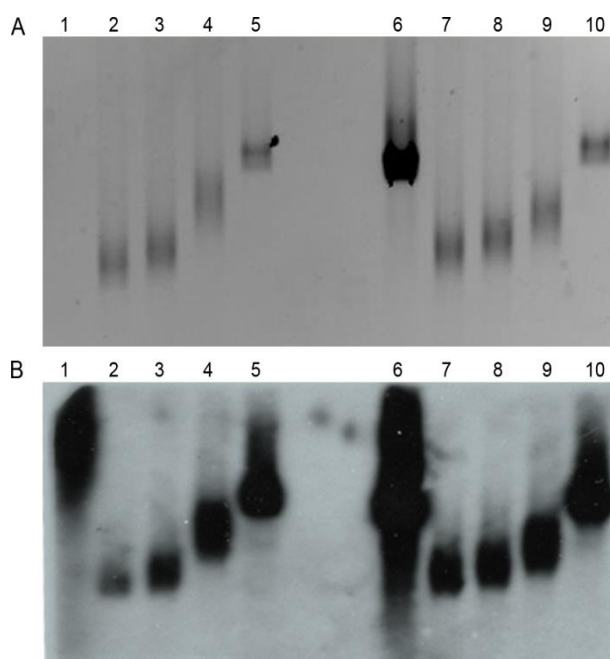


Figura 21. Reconstitución de VPg-dsRNA con HT-VP3. Análisis mediante ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA) en geles nativos de agarosa y (A) tinción con BrEt o (B) WB con anticuerpos α -VP3. (1) Fracción de HT-VP3 purificada; (2-5) VPg-dsRNA obtenido mediante diálisis de RNPs frente al tampón a pH 10 incubado con HT-VP3 en relaciones molares dsRNA:HT-VP3 de (2) 1:0, (3) 1:125, (4) 1:250 y (5) 1:500; (6) control de RNPs; (7-10) VPg-dsRNA obtenido mediante diálisis de RNPs frente al tampón a pH 11 incubado con HT-VP3 en relaciones molares dsRNA:HT-VP3 de (7) 1:0, (8) 1:125, (9) 1:250 y (10) 1:500.

A continuación nos propusimos determinar si las RNPs reconstituidas mostraban la actividad de síntesis de RNA observada previamente en las RNPs purificadas a partir de los viriones de IBDV. La funcionalidad de los complejos VPg-dsRNA reconstituidos con HT-VP3 fue evaluada en presencia de [32 P]-UTP siguiendo las condiciones óptimas para la actividad RNA polimerasa RNA dependiente asociada a las partículas virales (Spies *et al.*, 1987), y de la misma manera que se realizó previamente en nuestro laboratorio (Luque *et al.*, 2009b). Tras eliminar los nucleótidos no incorporados, los productos de reacción fueron analizados mediante

electroforesis en geles nativos de agarosa y autorradiografía (Figura 22A). En las reacciones correspondientes al complejo VPg-dsRNA reconstituido con HT-VP3 en una relación molar dsRNA:HT-VP3 de 1:250 o 1:500, al igual que con las partículas virales o las RNPs, (Figura 22A) se detectó la presencia de bandas marcadas radiactivamente con una acumulación de señal radioactiva a lo largo del tiempo. Las reacciones con viriones, RNPs y VPg-dsRNA reconstituido (relación 1:500) presentan una curva similar de incorporación de nucleótido marcado (Figura 22B). Por el contrario, en las reacciones llevadas a cabo con complejo VPg-dsRNA no reconstituido o reconstituido con una relación molar dsRNA:HT-VP3 1:125 no se detecta incorporación de nucleótido marcado (Figura 22). El complejo VPg-dsRNA reconstituido con una relación 1:250 presenta una curva intermedia entre ambos.

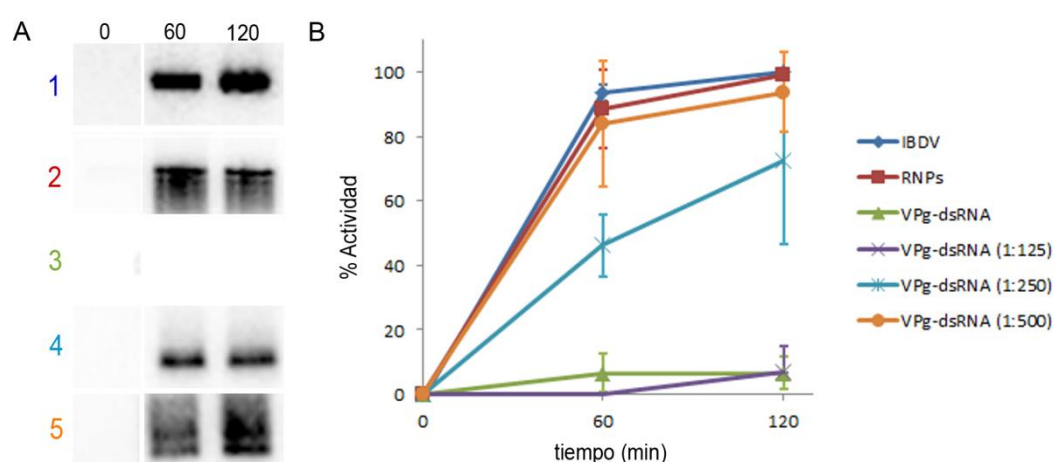


Figura 22. Caracterización funcional de RNPs reconstituidas. (A) Autorradiografías del análisis de los productos de reacción derivados del ensayo de actividad RNA polimerasa a distintos tiempos (0, 60 y 120 min) de un experimento individual de: (1) IBDV; (2) RNPs; (3) VPg-dsRNA; (4) VPg-dsRNA + HT-VP3 1:250; (5) VPg-dsRNA + HT-VP3 1:500. (B) Valores de actividad RNA polimerasa determinados mediante la incorporación de [³²P]-UTP de IBDV (azul), RNPs (rojo), VPg-dsRNA (verde), VPg-dsRNA + HT-VP3 1:125 (morado), VPg-dsRNA + HT-VP3 1:250 (azul cian) y VPg-dsRNA + HT-VP3 1:500 (naranja). Cada medida corresponde al promedio de la cuantificación de tres ensayos independientes normalizados asumiendo como 100% de actividad la máxima señal detectada. Las barras verticales indican la desviación estándar de cada valor.

Estos resultados sugieren que el complejo VPg-dsRNA obtenido en condiciones nativas interacciona de manera efectiva con una forma recombinante de VP3 (tras incubación a una relación molar dsRNA:HT-VP3 de 1:500) para reconstituir moléculas similares a las RNPs originales que son funcionalmente competentes para la síntesis de RNA en ausencia de VP2 y una cápsida estructuralmente íntegra.

4.2.3 Caracterización de la infectividad de las RNPs nativas y reconstituidas

Adicionalmente, se evaluó la capacidad infectiva de las RNPs y de los complejos VPg-dsRNA reconstituidos con distintas relaciones molares de VP3. Para ello, células aviares QM7 fueron

transfectadas con las distintas muestras manteniendo constante la cantidad de dsRNA (apartado 3.3.5). Cuando el efecto citopático era visible sobre las células, los sobrenadantes fueron titulados mediante ensayo de formación de placa a las 48 hpi (Figura 23A) y el extracto celular fue analizado mediante SDS-PAGE y WB con anticuerpos α -VP2 (Figura 23B) o WB con anticuerpos α -VP4 (Figura 23C).

Los resultados mostraron que el complejo VPg-dsRNA por sí solo no es infeccioso (título viral de 0 pfu/ml) (Figura 23A) y las células transfectadas no muestran expresión de VP2 y/o VP4 (Figuras 23B, C, carril 3). Por el contrario, la reconstitución gradual del complejo VPg-dsRNA con HT-VP3 recombinante resultó en un incremento gradual de los títulos virales (10^2 - 10^3 pfu/ml), y la expresión de VP2 y VP4 fue clara con los complejos VPg-dsRNA reconstituidos en una relación molar dsRNA:HT-VP3 de 1:500 (Figuras 23B, C, carril 6) como consecuencia de la generación de viriones funcionalmente competentes. Las RNPs fueron evaluadas siguiendo el mismo protocolo y mostraron títulos virales de 10^4 pfu/ml, y expresiones de VP2 y VP4 similares a los conseguidos con el complejo VPg-dsRNA completamente reconstituido con HT-VP3 (Figuras 23B, C, carril 7). Como control positivo se infectaron células QM7 con IBDV a una moi equivalente a la cantidad de dsRNA empleado en las transfecciones y se obtuvieron títulos virales (10^7 pfu/ml) y expresiones mayores de VP2 y VP4 (Figuras 23B, C, carril 8). Como controles negativos, las RNPs e IBDV fueron sometidos a inactivación térmica y al tratamiento con RNasa III (que degrada dsRNA de forma específica, apartado 3.3.5), siendo únicamente infeccioso IBDV incubado con RNasa III, debido a la protección de las RNPs por parte de la cápsida.

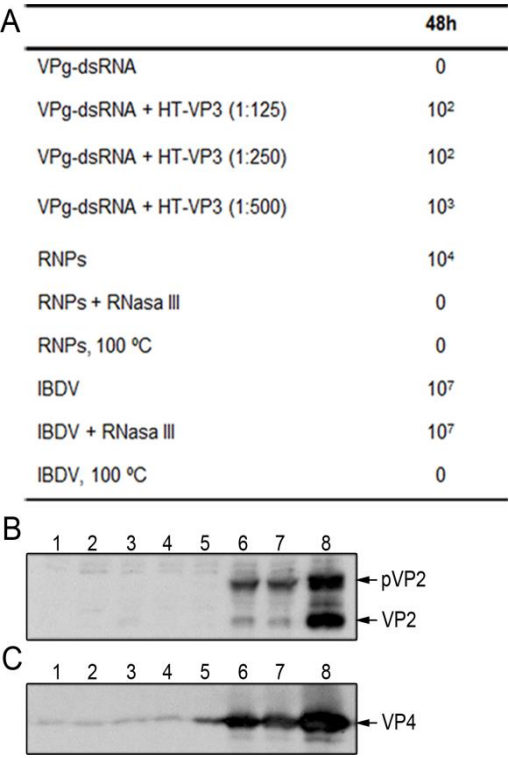


Figura 23. Análisis de la infectividad de las RNPs y los complejos VPg-dsRNA. (A) Titulación mediante ensayo de formación de placa a las 48 hpi de los sobrenadantes obtenidos tras la transfección de células QM7 con las distintas muestras indicadas. Cada valor corresponde al promedio de los valores de pfu/ml obtenidos en tres experimentos independientes. (B, C) Análisis mediante SDS-PAGE y (B) WB con anticuerpos α -VP2 o (C) WB con anticuerpos α -VP4 de los extractos de células QM7 transfectadas con (1) control de células QM7 sin transfectar; (2) tampón 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl; (3) VPg-dsRNA; (4) VPg-dsRNA + HT-VP3 (relación 1:125); (5) VPg-dsRNA + HT-VP3 (relación 1:250); (6) VPg-dsRNA + HT-VP3 (relación 1:500); (7) RNPs; (8) control de infección con IBDV. Las flechas indican las proteínas estructurales pVP2, VP2 y VP4.

Por tanto, las RNPs de IBDV, así como el complejo VPg-dsRNA reconstituido con VP3 recombinante, además de ser funcionalmente competentes para la síntesis de RNA en ausencia de VP2, también generan una progenie viral competente en células transfectadas.

4.3 Análisis estructural de RNPs de IBDV

4.3.1 Caracterización estructural de RNPs de IBDV por microscopía electrónica y tinción negativa

Las RNPs de IBDV purificadas mediante ultracentrifugación en gradientes discontinuos de glicerol fueron sometidas a un gradiente consecutivo en las mismas condiciones que el anterior (apartado 3.4.3). Las fracciones 6-7 del segundo gradiente de glicerol fueron analizadas mediante ME y tinción negativa con acetato de uranilo al 2% (Figura 24A). Las RNPs se resuelven individualmente y tienen una estructura de aspecto filamentoso (Figura 24A), con posibles patrones helicoidales en algunas regiones del filamento (Figura 24A, recuadros 1-5). Los filamentos individuales de RNPs tienen una longitud media de 0.89 ± 0.03 y 0.78 ± 0.03 μm y un diámetro de $\sim 30\text{-}40$ nm.

A partir de estas imágenes de los filamentos teñidos negativamente, se seleccionaron 19,826 segmentos individuales, solapantes entre sí, y fueron extraídos con distintas longitudes (desde 6.5 a 27.5 nm) con el objetivo de determinar la estructura repetitiva de la hipotética red helicoidal. Las imágenes bidimensionales medias calculadas mostraron una elevada heterogeneidad de los filamentos de RNPs (Figura 24B). Considerando las dimensiones del dsRNA, VP3 y las estructuras filamentosas, se estimaron distintos parámetros de elevación axial y ángulo de rotación para algunas de las imágenes medias (por ejemplo, la primera imagen de la Figura 24B). La 3DR de los filamentos de RNPs se realizó siguiendo el algoritmo de refinamiento iterativo de reconstrucción helicoidal en espacio real (IHRSR) (Egelman, 2010) (apartado 3.7.5). Como referencia inicial para la determinación del origen y orientación de las partículas se usó un volumen cilíndrico con las dimensiones del filamento de RNPs. Partiendo de los distintos parámetros estimados para la hélice de RNPs el algoritmo IHRSR no converge a un valor estable en ninguno de los casos (no mostrado).

El análisis de las RNPs de IBDV mediante inmunomarcaje con sueros policlonales α -VP3 y α -VP1 (Figura 25) y tinción negativa reveló la distribución homogénea de VP3 a lo largo de los filamentos y la localización de VP1/VPg en los extremos de los filamentos.

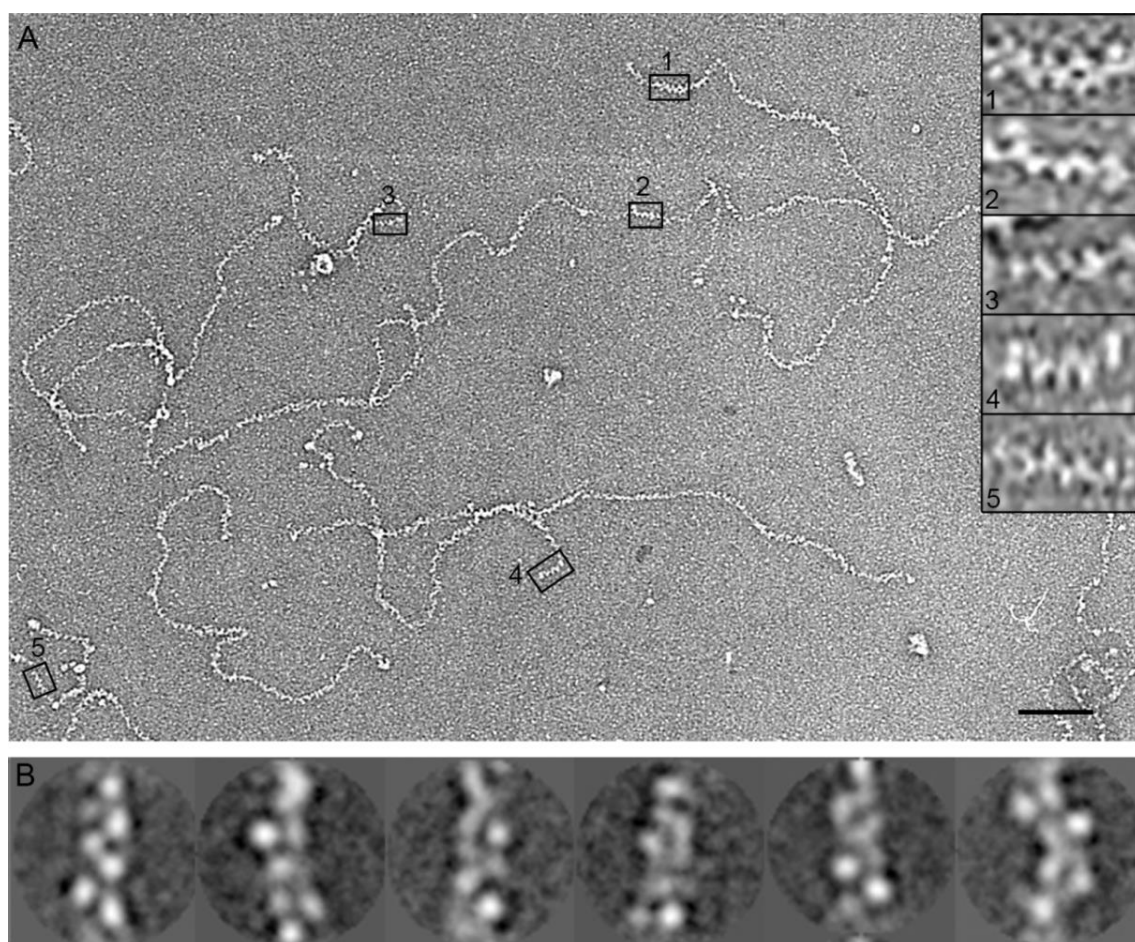


Figura 24. Análisis estructural de RNPs de IBDV. (A) Análisis mediante ME y tinción negativa de RNPs obtenidas mediante diálisis de IBDV frente a tampón de baja fuerza iónica Tris-EDTA y purificadas mediante ultracentrifugación en dos gradientes discontinuos de glicerol consecutivos. Los recuadros interiores 1-5 corresponden a segmentos de filamentos de RNPs que muestran un patrón con posibles características helicoidales. La barra de escala corresponde a 100 nm. (B) Clases medias bidimensionales representativas obtenidas mediante alineamiento y promediado de segmentos solapantes derivados de los filamentos de RNPs.

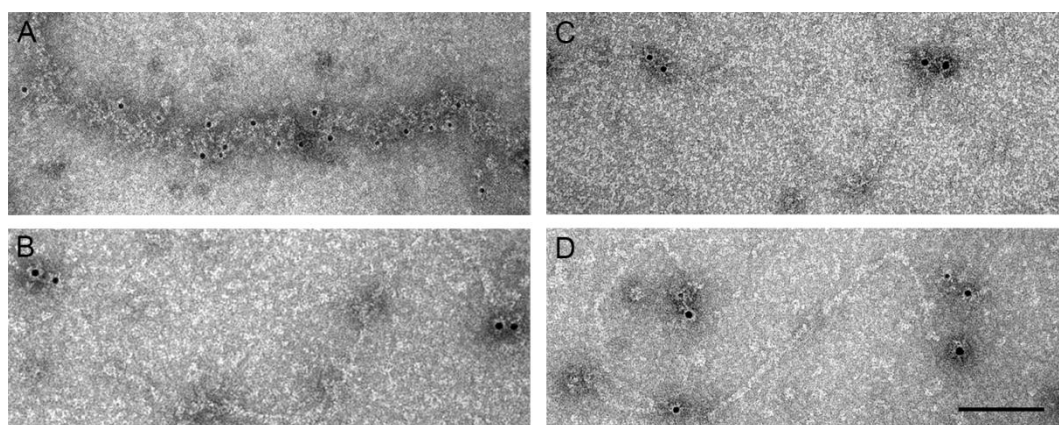


Figura 25. Caracterización de RNPs de IBDV por inmunomarcaje. Análisis por ME mediante inmunomarcaje con (A) sueros policlonales α -VP3 y (B-D) α -VP1 y partículas de oro coloidal de 5 nm de diámetro y tinción negativa de RNPs obtenidas mediante diálisis de IBDV frente a tampón Tris-EDTA y purificadas mediante ultracentrifugación en dos gradientes discontinuos de glicerol. La barra de escala corresponde a 100 nm.

4.3.2 Caracterización estructural de RNPs de IBDV por criomicroscopía electrónica

Las RNPs de IBDV analizadas por ME y tinción negativa o por inmunomarcaje (Figuras 24 y 24) también fueron vitrificadas y analizadas mediante crioME (Figura 26A). En las criomicrografías electrónicas es posible visualizar filamentos individuales, al igual que se observan en otras preparaciones de virus que han liberado su genoma. Se seleccionaron un total de 307 segmentos no solapantes a partir de filamentos rectos de RNPs. La imagen media bidimensional resultante (Figura 26A, recuadro) reveló un aspecto de cuentas sobre una cuerda que se corresponde con las densidades de VP3 unida no covalentemente sobre el filamento de dsRNA con una separación media de ~ 71 Å entre densidades adyacentes (Figura 26B). Los valores medios del diámetro de los filamentos fueron de 47 y 35 Å, correspondientes a las zonas de mayor y menor densidad (Figura 26C).

Considerando que el dsRNA es una estructura dúplex de tipo A con un paso de rosca o *pitch* de 2.81-3.0 Å/pb (Arnott *et al.*, 1972; Nibert y Schiff, 2001), la longitud de los segmentos A (3.2kb) y B (2.8 kb) es de 0.9-0.96 y 0.79-0.84 μm , respectivamente. Estas mediciones se ajustan a los valores estimados a partir de imágenes de ME por tinción negativa de 0.89 ± 0.03 y 0.78 ± 0.03 μm (Figura 24). Por otra parte, los virus de las poblaciones E5-E6 contienen cuatro RNPs ($\sim 12\text{kb}$) (Luque *et al.*, 2009a) recubiertas homogéneamente por ~ 450 moléculas de VP3 (Luque *et al.*, 2009b). Asumiendo que la mayor parte de las moléculas de VP3 están unidas al dsRNA viral, los filamentos de las RNPs (donde VP3 no introduce compactación del genoma) contienen una molécula de VP3 cada 26 pb o, lo que es lo mismo, cada ~ 73 Å, un valor consistente con el determinado experimentalmente por ME de ~ 71 Å (Figura 26B).

En conjunto, los análisis estructurales mediante ME y crioME sugieren que las RNPs de IBDV son estructuras filamentosas sin simetría helicoidal recubiertas homogéneamente por monómeros de VP3 con una separación de ~ 71 Å entre moléculas adyacentes.

4.3.3 Caracterización estructural de extremos de RNPs por microscopía electrónica

Las imágenes de RNPs purificadas mediante ultracentrifugación en gradientes discontinuos de glicerol y analizadas por ME y tinción negativa muestran que la mayoría de los extremos de los filamentos tiene una densidad extra que, en principio, se correspondería con VPg. Para analizarlo en detalle, fueron seleccionados un total de 196 filamentos individuales de RNPs en los que ambos extremos pueden ser unidos sin ambigüedades (Figura 27A, círculos rojos). Algunas imágenes individuales de los extremos de las RNPs sugerían la presencia de una o dos

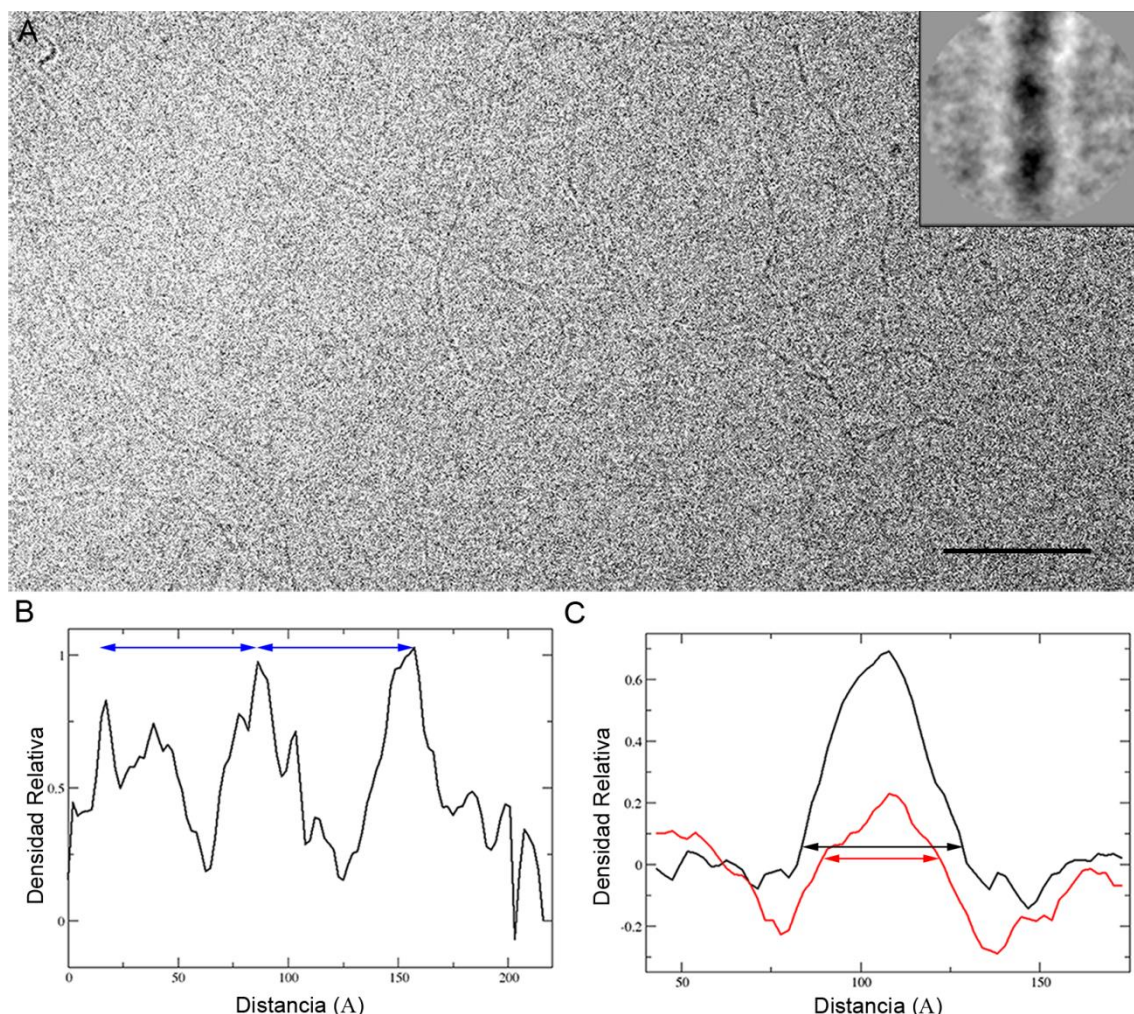


Figura 26. Análisis estructural por criome de RNPs de IBDV. (A) Criomicrografía electrónica de RNPs de IBDV. La barra de escala corresponde a 25 nm. El recuadro corresponde a la imagen media bidimensional obtenida mediante alineamiento y promediado de 307 segmentos de filamentos rectos de RNPs. (B) Plot de distribución de densidades en el eje axial de la imagen media de los filamentos de RNPs. La distancia media entre los máximos de densidad es ~ 71 Å. (C) Plot de distribución de densidades en el eje transversal de la imagen media de los filamentos de RNPs. Las zonas de menor densidad (línea roja) se corresponden a dsRNA sin VP3 y las zonas de mayor densidad (línea negra) a RNPs. Las flechas indican valores medios de ~ 35 y ~ 47 Å, respectivamente.

densidades (Figura 27B). El análisis de las imágenes medias bidimensionales de los extremos mostró la existencia de extremos con una densidad semicircular de dimensiones 9.4×7.2 nm, o dos densidades de 6.2×8.1 y 6.6×8.2 nm (Figura 27C) que se deben corresponder con moléculas de VP1/VPg. El análisis estadístico de las 196 RNPs indica que el 15% tiene una molécula de VP1/VPg en cada extremo (disposición “1+1”), el 65% tiene una molécula en un extremo y dos en el extremo contrario (“1+2”), y el 20% restante tiene dos moléculas en cada extremo (“2+2”) (Figura 27D).

Estos resultados sugieren la presencia de al menos una molécula de VPg (VP1 unida covalentemente al dsRNA) en cada extremo 5' de las moléculas de dsRNA en cada RNP. Es

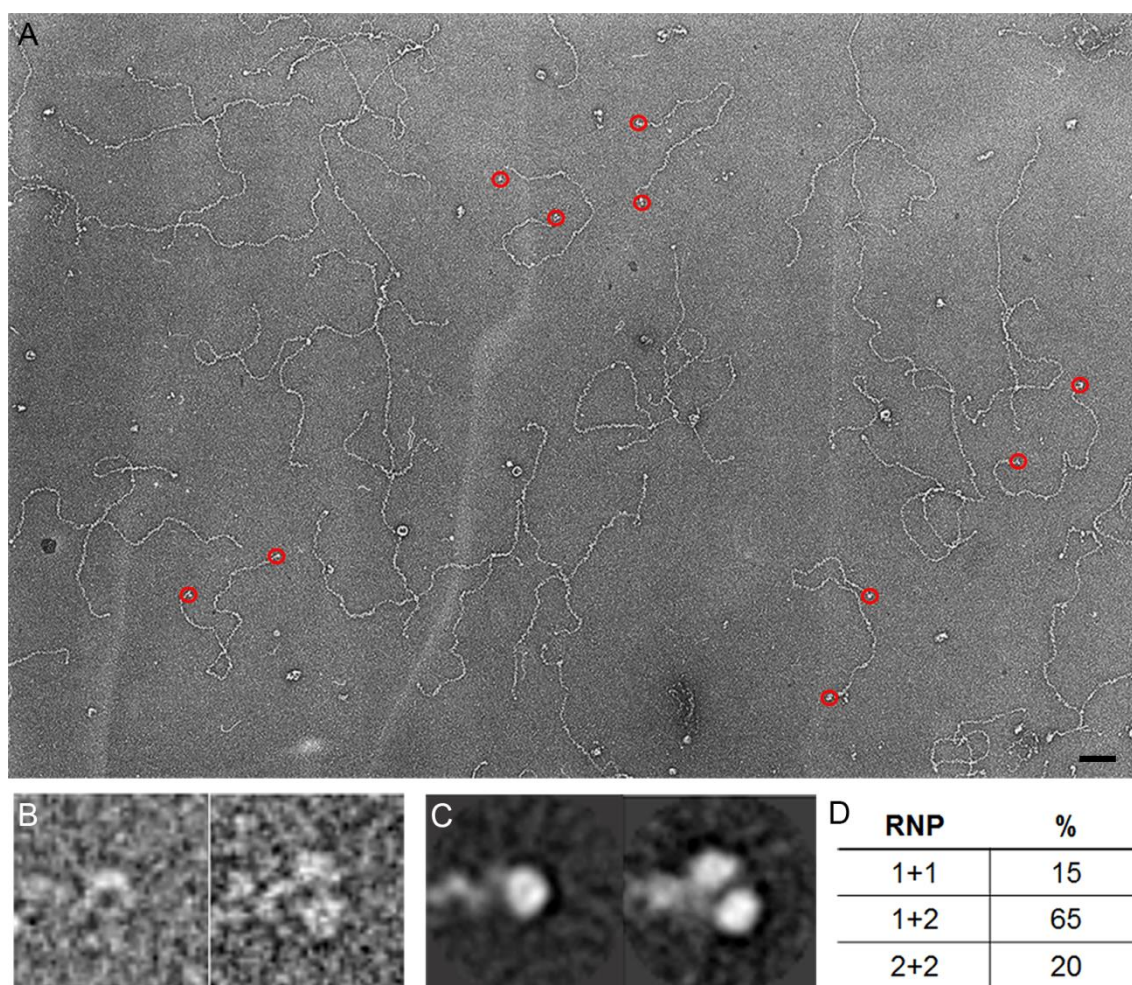


Figura 27. Caracterización estructural de los extremos de RNPs de IBDV. (A) Análisis mediante ME y tinción negativa de RNPs obtenidas mediante diálisis de IBDV frente a tampón Tris-EDTA. La barra de escala corresponde a 100 nm. Los círculos rojos indican los dos extremos de cada RNP individual incluida en el análisis estadístico. (B) Imágenes individuales de extremos seleccionados donde se aprecia una o dos densidades circulares. (C) Clases medias bidimensionales obtenidas mediante alineamiento y promediado de los 392 extremos de RNPs incluidos una o dos densidades correspondientes a moléculas de VP1/VPg. (D) Análisis estadístico de los dos extremos de cada RNP (N= 196). La disposición “1+1” indica una molécula de VP1/VPg en cada extremo; la disposición “1+2” una molécula en un extremo y dos en el otro; y la disposición “2+2”, dos moléculas en cada extremo.

interesante destacar que estas RNPs, son purificadas en condiciones no desnaturalizantes y que son funcionalmente activas. Las RNPs de tipo “1+2” ó “2+2” representan el 85% de la población total, lo que implica que más de la mitad de los extremos analizados contienen, además de VPg, posiblemente otra molécula de VP1 ya que ambas densidades tienen un tamaño y morfología similares.

4.3.4 Microscopía electrónica tridimensional de VP1

Para identificar si las densidades detectadas en los extremos de las RNPs se corresponden con VP1/VPg, procedimos a analizar VP1 purificada mediante ME y tinción negativa, aunque se

dispone de la estructura atómica de la VP1 de IBDV (código de acceso PDB: 2PUS; Garriga *et al.*, 2007). Células H5 fueron infectadas con el rBV HT-VP1 (moi 1-5 pfu/cel) y recogidas a 48 hpi. HT-VP1 purificada mediante cromatografía de afinidad por el tag de His (apartado 3.4.6) fue analizada por ME y tinción negativa (Figura 28A). El análisis de las imágenes medias bidimensionales mostró distintas orientaciones de HT-VP1 (Figura 28B), y se seleccionaron 40,000 partículas de las 113,433 originales. La 3DR de HT-VP1 (Figura 28D) fue calculada utilizando como modelo inicial un mapa de ruido y la resolución obtenida mediante el cálculo de la función FSC (a 0.5) fue de 16 Å. El modelo calculado a partir de muestras de VP1 teñidas negativamente es muy similar al modelo atómico de VP1 filtrado a 20 Å de resolución (Figura 28C). Las dimensiones de ambas estructuras, 6x6.4x8.7 nm para el modelo de ME y 6.2x6.5x8.8 nm para el modelo atómico, son prácticamente idénticas.

El ajuste cuantitativo del modelo atómico de VP1 como un cuerpo rígido en el mapa de densidad obtenido mediante el uso del programa Chimera mostró un porcentaje de ajuste del 95% (Figura 28E). La estructura de ME consiste en una superficie anular que se corresponde con los dominios amino terminal, la palma y los dedos internos. A ambos extremos del anillo y perpendiculares a su superficie se extienden dos protrusiones paralelas entre sí que se corresponden con los dominios de los dedos externos y el pulgar (Figuras 28D, E).

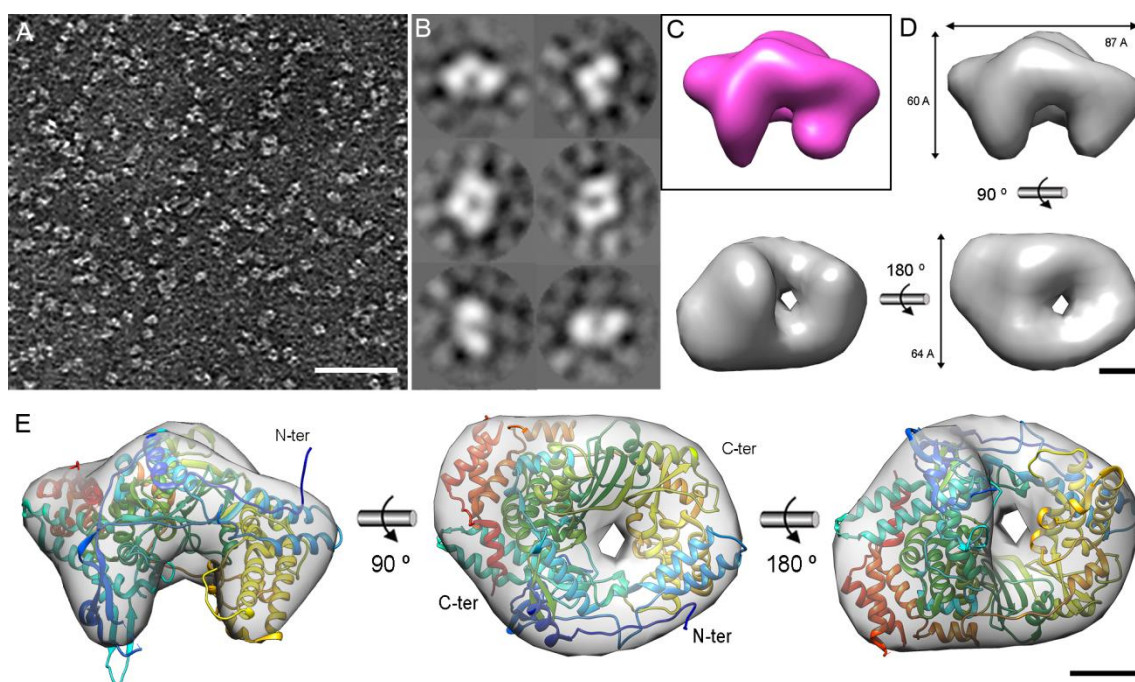


Figura 28. Análisis estructural de VP1 mediante ME y tinción negativa. (A) Análisis por ME y tinción negativa de HT-VP1 procedente de células H5 infectadas con el rBV HT-VP1. La barra de escala corresponde a 50 nm. (B) Clases medias bidimensionales representativas de una vista lateral (fila superior), vista superior (fila intermedia) y vista inferior (fila inferior), obtenidas mediante alineamiento y promediado de todas las partículas de VP1. (C) Modelo atómico de VP1 de IBDV (Código de acceso PDB: 2PUS; Garriga *et al.*, 2007) filtrado a 20 Å de resolución. (D) Vistas lateral (arriba), superior (centro) e inferior (abajo) de la 3DR de VP1. (E) Ajuste del modelo atómico de VP1 de IBDV como un cuerpo rígido sobre el mapa de densidad obtenido por ME. (C, D) Las barras de escala corresponden a 20 Å.

4.3.5 Microscopía electrónica tridimensional de extremos de RNPs de IBDV

Una vez determinada la estructura de VP1 mediante ME y tinción negativa, procedimos al análisis de los extremos de las RNPs, seleccionándolos como partículas individuales, independientemente de que ambos extremos fueran trazables de RNPs individuales (Figura 29A, círculos rojos y amarillos). A partir de la inspección de sus imágenes medias bidimensionales (como en la Figura 27B), se seleccionaron 10,747 extremos con una molécula de VP1/VPg. La 3DR de los extremos con una molécula de VP1/VPg fue calculada utilizando como modelo inicial un mapa de ruido y la resolución obtenida mediante el cálculo de la función FSC (a 0.5) fue de 25.6 Å (Figuras 29B-D). El modelo calculado para la densidad de los extremos de las RNPs y el mapa de densidad de VP1 calculado previamente son consistentes entre sí ya que muestran similares características estructurales, y se ajustan con bastante exactitud (Figura 29B). Asimismo, el modelo atómico de VP1 (PDB: 2PUS; Garriga *et al.*, 2007) fue ajustado como un cuerpo rígido sobre el mapa de densidad obtenido (Figura 29C). El conjunto de estos análisis estructurales, en combinación con los estudios de inmunomarcaje y los análisis bioquímicos previos, indican que la densidad de los extremos de las RNPs se corresponde con VPg. La representación del mapa de densidad a 2σ respecto a la densidad media (Figura 29D) sugiere el punto de conexión de la polimerasa viral con el inicio del filamento de RNP.

Por otro lado, el análisis de las imágenes medias bidimensionales de los extremos de RNPs con dos moléculas de VP1/VPg reveló la existencia de una elevada heterogeneidad en la disposición de las dos densidades correspondientes a moléculas de la polimerasa viral respecto al filamento de RNP, distinguiéndose al menos tres clases (Figura 30A). A partir de la clase más numerosa de partículas que engloba al 60% del total (4,132 partículas; Figura 30A, centro) se calculó una 3DR con una limitada resolución de ~ 35 Å (FSC 0.5). El tamaño de las densidades reconstruidas es compatible con el de la VP1 determinada tanto a partir de los extremos de las RNPs con una densidad como a partir de la VP1 soluble. El punto de conexión con el filamento de RNP se encuentra localizado sobre una de las dos densidades, lo que sugiere la interacción covalente sólo con una de ellas (correspondiente a VPg) mientras que la otra (VP1) interacciona con VPg.

En resumen, los análisis estructurales de las RNPs mediante ME y tinción negativa indican la presencia de al menos una molécula de VPg asociada a cada extremo 5' de las RNPs, y en muchos extremos se localiza además otra molécula de VP1.

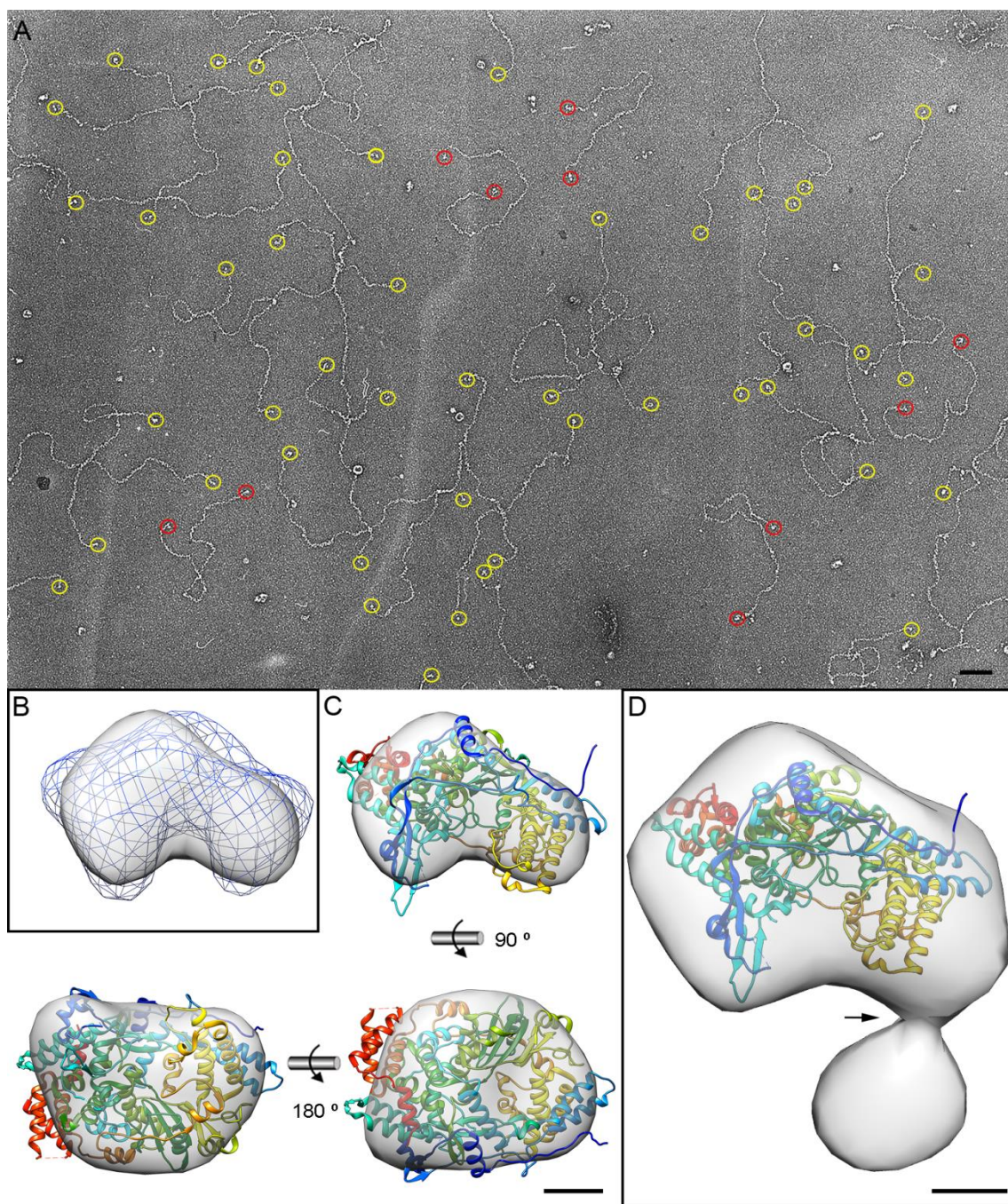


Figura 29. Caracterización estructural de los extremos de RNPs de IBDV con una molécula de VP1/VPg. (A) Análisis por ME y tinción negativa de RNPs. La barra de escala corresponde a 100 nm. En círculos rojos se indican los dos extremos de RNPs individuales y en círculos amarillos los extremos del resto de RNPs. (B) Ajuste del mapa de densidad de VP1 obtenido por ME (malla azul) en la 3DR de los extremos de RNPs con una molécula de VPg (gris). (C) Vistas lateral (arriba), superior (abajo, derecha) e inferior (abajo, izquierda) del ajuste del modelo atómico de VP1 (PDB: 2PUS; Garriga *et al.*, 2007) sobre el mapa de densidad obtenido por ME de los extremos de RNPs con una molécula de VPg. (D) Ajuste del modelo atómico de VP1 sobre el mapa de densidad umbralizado a 2σ sobre la densidad media para mostrar el punto de conexión con el inicio del filamento de RNP (flecha). Las barras de escala corresponden a 20 Å.

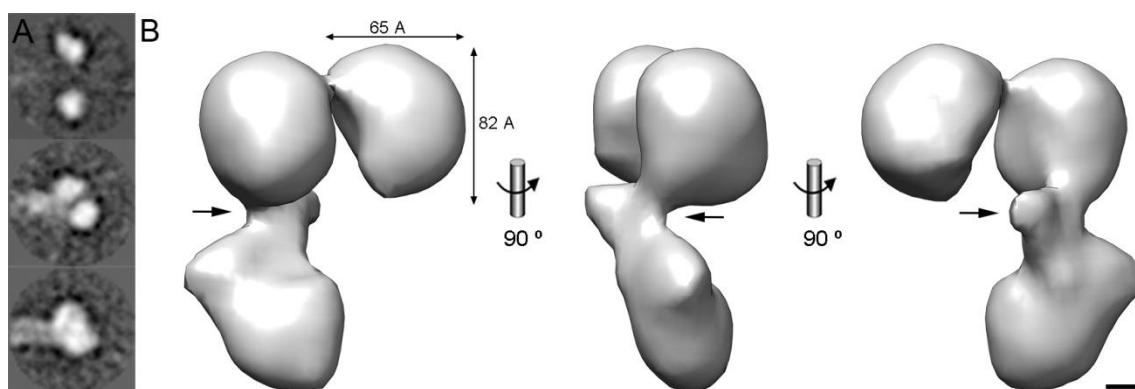


Figura 30. Caracterización estructural de los extremos de RNPs con dos moléculas de VP1/VPg. (A) Clases medias bidimensionales de extremos de RNPs con dos moléculas de VP1/VPg obtenidas mediante alineamiento y promediado de 6,940 partículas. (B) Diferentes vistas de la 3DR obtenida a partir de las partículas de extremos de RNPs en las que las moléculas de VP1/VPg se encuentran más próximas entre sí. Las flechas indican el punto de conexión con el inicio del filamento de RNP. La barra de escala corresponde a 20 Å.

4.4 Análisis de IBDV mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

4.4.1 Propiedades mecánicas de las poblaciones de IBDV

Las diferentes poblaciones de IBDV fueron sometidas a experimentos de nanoindentación mediante AFM (apartado 3.6) (Hernando-Pérez *et al.*, 2014) para evaluar la influencia de una diferencia en contenido genómico en las propiedades del virus, entre ellas la rigidez mecánica de la cápsida (Figura 31). De forma general, cuando se llevan a cabo indentaciones dentro del rango de grosor de la cápsida, se produce una deformación lineal reversible representada por un modelo elástico continuo. Se realizaron 89-131 indentaciones sobre 21-28 cápsidas T=13 individuales para cada población de IBDV (Figuras 31A-F). El ajuste de estos datos a una distribución Gaussiana reveló constantes de elasticidad $kE1 = 0.346 \pm 0.118$ N/m (Figura 31A); $kE2 = 0.347 \pm 0.106$ N/m (Figura 31B); $kE3 = 0.426 \pm 0.121$ N/m (Figura 31C); $kE4 = 0.505 \pm 0.109$ N/m (Figura 31D); $kE5 = 0.580 \pm 0.116$ N/m (Figura 31E); $kE6 = 0.697 \pm 0.177$ N/m (Figura 31F). Estos resultados mostraron que aunque la morfología y tamaño de las partículas virales son idénticos en todas las poblaciones, la rigidez aumenta con el incremento progresivo del contenido genómico empaquetado en cada población (desde partículas E1 vacías a partículas E5-E6 con cuatro RNPs).

4.4.2 Caracterización bioquímica y por microscopía electrónica de VLPs de IBDV

Considerando que VP3 está unida al dsRNA genómico para formar RNPs dentro de los viriones (Luque *et al.*, 2009b), el fortalecimiento descrito en el apartado anterior podría estar mediado por el complejo dsRNA-VP3 o por cada uno de sus componentes individuales. Las propiedades

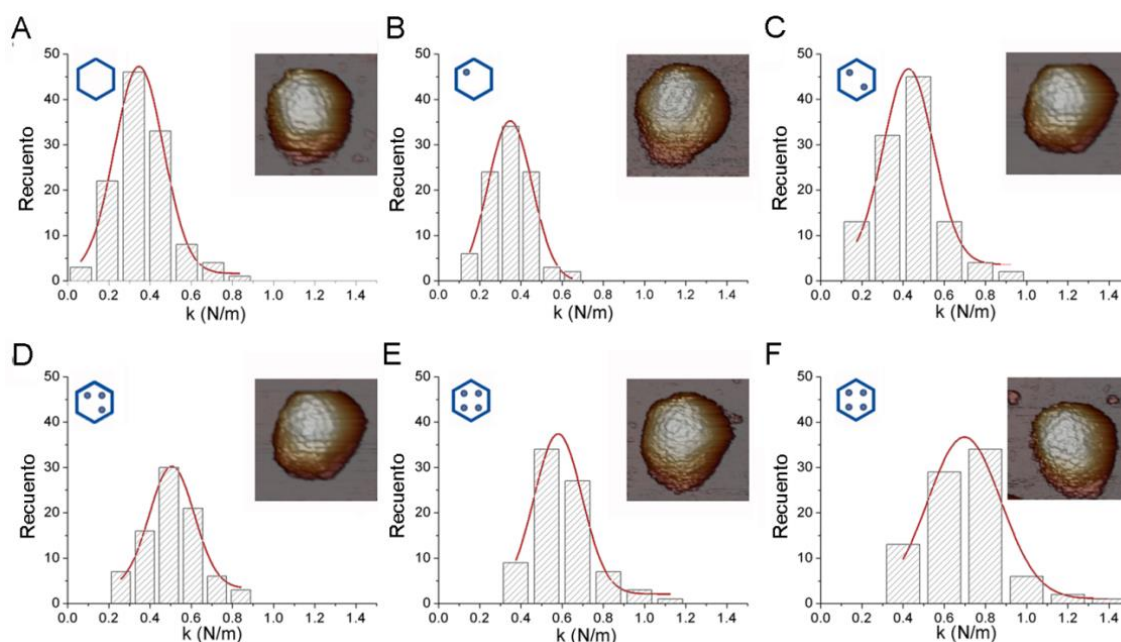


Figura 31. Rigidez mecánica de las poblaciones de IBDV. (A-F) Histogramas de las pendientes de las curvas de indentación llevadas a cabo sobre partículas individuales de las poblaciones E1 (A), E2 (B), E3 (C), E4 (D), E5 (E) y E6 (F) de IBDV. Se representan los valores de rigidez mecánica (constante de elasticidad, k) de partículas individuales después de la nanoindentación. El valor medio de k para cada población, calculado mediante ajuste a una distribución Gaussiana fue de: (A) $k_{E1} = 0.346 \pm 0.118$ N/m; (B) $k_{E2} = 0.347 \pm 0.106$ N/m; (C) $k_{E3} = 0.426 \pm 0.121$ N/m; (D) $k_{E4} = 0.505 \pm 0.109$ N/m; (E) $k_{E5} = 0.580 \pm 0.116$ N/m; (F) $k_{E6} = 0.697 \pm 0.177$ N/m. En los recuadros se muestran imágenes de AFM (160x160 nm²) de partículas individuales de cada población de IBDV (esquina superior derecha). Los diagramas localizados en la esquina superior izquierda representan la cantidad de RNPs (puntos) empaquetadas en cada población de IBDV (como en la Figura 13).

mecánicas de viriones y pseudo-partículas virales (VLPs) de IBDV fueron comparadas para determinar el componente implicado. Las VLPs fueron producidas mediante la expresión de la poliproteína en un sistema recombinante basado en virus vaccinia (Castón *et al.*, 2008; Lombardo *et al.*, 1999).

Las VLPs fueron purificadas mediante ultracentrifugación en dos gradientes consecutivos de sacarosa y CsCl (apartado 3.4.1), y se obtuvieron dos bandas de distinta densidad (Figura 32A), la banda superior correspondiente a VLPs vacías (E) y la banda inferior correspondiente a VLPs llenas (F) (Figura 32E). En este sistema de expresión heteróloga, la poliproteína de IBDV es procesada correctamente y la mayoría de las VLPs son ensambladas en cápsidas T=13 de forma y tamaño idénticos a los viriones (Figuras 32B, C). El análisis mediante SDS-PAGE mostró que los dos tipos de VLPs estaban compuestas por las mismas proteínas estructurales de IBDV (excepto VP1), con cantidades variables de pVP2/VP2 (Figura 32D). El análisis mediante electroforesis en geles nativos de agarosa mostró que las VLPs llenas contienen ssRNAs mensajeros celulares heterogéneos encapsidados de manera no específica (Figura 32E).

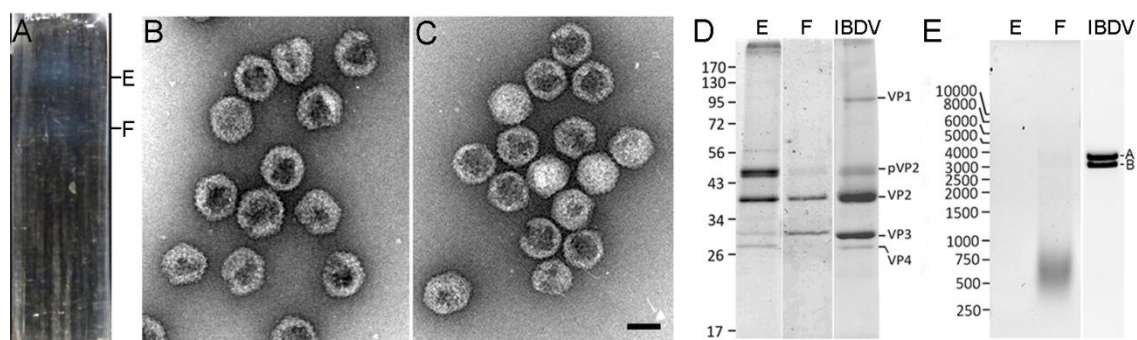


Figura 32. Análisis bioquímico y por ME de VLPs derivadas de la expresión de rVV VT7/LacOI/Poly. (A) Gradiente lineal de CsCl iluminado desde la parte inferior del tubo después de la ultracentrifugación de VLPs de IBDV; se observan dos bandas correspondientes a VLPs vacías (E) y llenas (F). (B, C) Análisis por ME y tinción negativa de VLPs (B) vacías y (C) llenas. La barra de escala corresponde a 50 nm. (D) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie de VLPs (E) vacías y (F) llenas y (IBDV) la población E5 de IBDV como control. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda en kDa. Se indican las proteínas estructurales VP1, pVP2, VP2, VP3 y VP4. (E) Análisis mediante geles nativos de agarosa y tinción con BrEt de los ácidos nucleicos contenidos en las VLPs (E) vacías y (F) llenas, y (IBDV) en la población E5 de IBDV como control. Los marcadores de peso molecular se indican a la izquierda (pb). El ssRNA celular se resuelve como una banda difusa (F), y se indican las bandas del dsRNA A y B (IBDV).

4.4.3 Propiedades mecánicas de VLPs de IBDV

Las VLPs vacías y llenas de IBDV fueron sometidas a experimentos de nanoindentación en las mismas condiciones que las poblaciones de IBDV. La constante de elasticidad para las VLPs vacías fue $k_{EVLVP} = 0.277 \pm 0.088$ N/m (Figura 33A), y para las VLPs llenas $k_{FVLVP} = 0.320 \pm 0.134$ N/m (Figura 33B). Estos valores de rigidez fueron inferiores a los de las poblaciones E2-E6 que contienen dsRNA, pero similares a los de la población E1 (Figura 33C), sugiriendo que en ausencia de dsRNA (población E1 y VLPs vacías) VP3 no incrementa la rigidez de las partículas. La presencia de ssRNA inespecífico en el interior de las VLPs, independientemente de su unión o no a VP3, no conlleva ningún efecto en las propiedades mecánicas de la cápsida. Estos resultados indican un papel específico de las RNPs en el reforzamiento mecánico de las cápsidas de IBDV, aunque también podría deberse a la acción del dsRNA por sí solo.

4.4.4 Análisis de las poblaciones de IBDV por fatiga mecánica

Para caracterizar el reforzamiento mecánico de las cápsidas de IBDV mediado por las RNPs, las diferentes poblaciones de IBDV fueron sometidas a experimentos de fatiga mecánica, que consisten en ciclos iterativos de aplicación de fuerzas por debajo de la fuerza de ruptura (~150 pN) sobre partículas individuales monitorizadas a tiempo real (Ortega-Esteban *et al.*, 2012; Ortega-Esteban *et al.*, 2013). La cápsida T=13 de IBDV, que tiene un grosor de ~10 nm y un radio interno de ~26 nm, fue desestructurada mediante esta metodología de manera controlada para cada población viral, liberando fragmentos de la envuelta proteica y permitiendo el acceso al núcleo interno de RNPs (Figura 34).

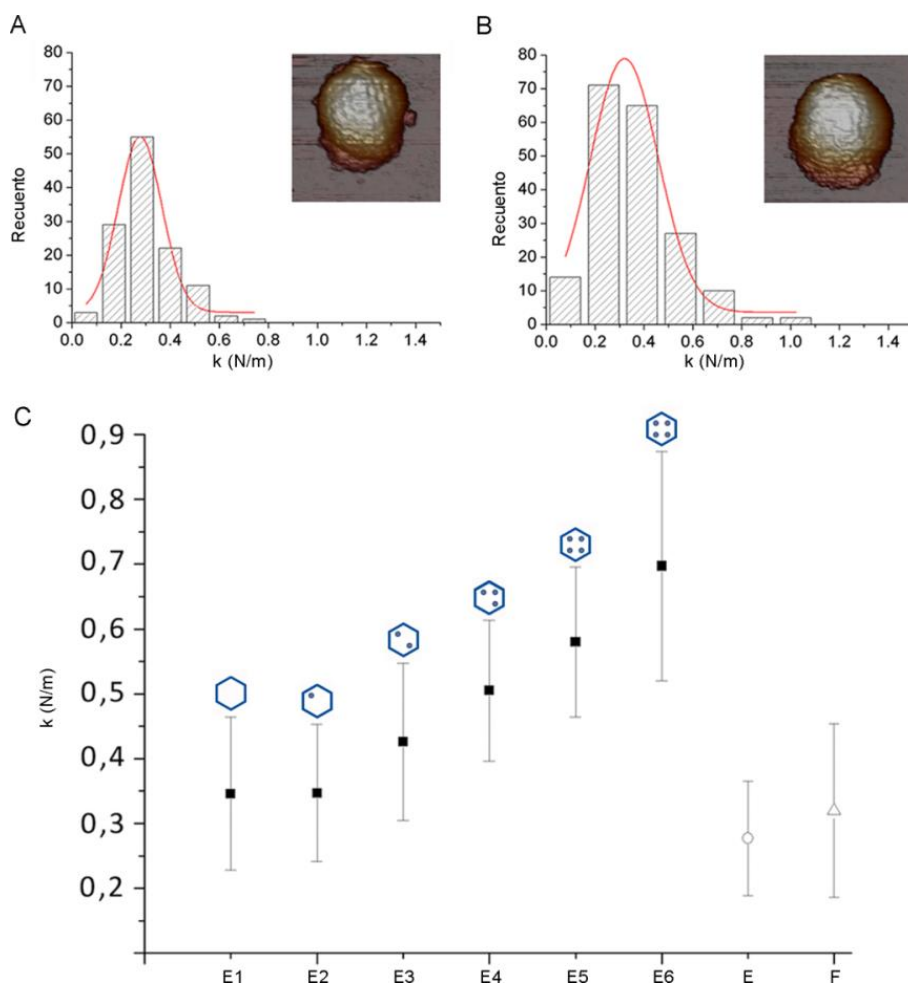


Figura 33. Rigidez mecánica de VLPs de IBDV y comparación con las poblaciones de IBDV. (A, B) Histogramas de las pendientes de las curvas de indentación llevadas a cabo sobre partículas individuales de VLPs (A) vacías y (B) llenas. Se representan los valores de rigidez mecánica (constante de elasticidad, k) de partículas individuales después de la nanoindentación. El valor medio de k para cada muestra, calculado mediante ajuste a una distribución Gaussiana fue de: (A) $k_{\text{EVLP}} = 0.277 \pm 0.088$ N/m; (B) $k_{\text{FVLP}} = 0.320 \pm 0.134$ N/m. En los recuadros se muestran imágenes de AFM (160×160 nm²) de VLPs individuales (esquina superior derecha). (C) Comparación de los valores promedio de rigidez de las poblaciones E1-E6 de IBDV y de las VLPs vacías (E) y llenas (F). Las barras verticales indican la desviación estándar de cada valor. Los diagramas representan la cantidad de RNPs de cada población (como en la Figura 13).

El comportamiento de fatiga fue similar en las poblaciones E1 (sin dsRNA) y E2 (1 RNP). Se muestra un análisis representativo de una partícula E2 que fue indentada 16 veces (~64 min) (Figura 34A). En la primera imagen instantánea la partícula E2 intacta tiene una altura de ~68 nm (Figura 34B, línea negra). Las imágenes 6-11 mostraron una ruptura de la cápsida originada por una pequeña fractura que provocó una destrucción completa de la partícula que, tras la imagen 14, se observa colapsada en restos de ~20 nm de altura (imagen 16, Figura 34B, línea roja). Estos resultados sugieren que inicialmente se eliminan algunos capsómeros, debilitando la envuelta viral, hasta su ruptura completa. En cambio, el comportamiento de las partículas E5-E6 (4 RNPs) mostró una ruptura en etapas definidas. La ruptura de una partícula E5 (Figura 34C)

comienza con la disociación de algunos capsómeros de manera similar a la partícula E2 (imágenes 6-10). En las imágenes subsiguientes se mantiene la integridad estructural. La parte superior de la partícula correspondiente a la envuelta proteica es separada (imágenes 11-14) exponiendo el núcleo interno de RNPs. La partícula E5 con la parte restante de la cápsida T=13 es relativamente estable y tiene una altura de ~35 nm (imagen 18, Figura 34D). Este comportamiento sugiere que las RNPs estabilizan la cápsida y previenen la destrucción de la partícula, incluso en condiciones en las que una gran parte de la envuelta proteica está ausente.

El seguimiento de la altura de las partículas durante los ensayos de fatiga mecánica para cada población mostró una respuesta específica para cada población viral. Las partículas E1 y E2 mostraron un patrón de ruptura caracterizado por la rápida destrucción de la cápsida en un único paso (Figura 34E), a pesar de la variación en el inicio de la ruptura de cada partícula. Las partículas E5 y E6 mostraron un patrón de ruptura en tres pasos definidos, comenzando con la eliminación de la parte superior de la envuelta (~10 nm), y seguido por la eliminación consecutiva de dos estructuras de ~20 nm hasta la pared restante de la cápsida unida a la superficie de adhesión (Figura 34F, líneas discontinuas).

Los experimentos de fatiga sobre partículas E3 y E4 mostraron que, mientras las partículas E4 (3 RNPs) tienen un comportamiento de ruptura en un único paso similar al de las partículas E1-E2 (Figura 34G), las partículas E3 (2 RNPs) muestran un patrón con tres pasos definidos similar al de las partículas E5-E6 (Figura 34H). El retraso en el inicio de la ruptura de las partículas E4 respecto a las partículas E1-E2 probablemente es debido al reforzamiento mecánico por el mayor número de RNPs empaquetadas.

4.4.5 Ensamblaje reversible de RNPs de IBVD en dímeros y estructuras complejas

Una vez que ha sido desmantelada la superficie externa de la cápsida T=13, la detección de las dos etapas en el patrón de ruptura de las partículas E3 y E5 (con 2 y 4 RNPs, respectivamente) es consistente con la existencia de dos intermediarios durante el desmantelamiento progresivo del virión. Sin embargo, estas dos etapas no se detectan en los perfiles de E2 y E4 (con 1 y 3 RNPs, respectivamente), por lo que la organización de las RNPs debe ser diferente para influenciar de manera tan distinta la estabilidad del virus. Por ello evaluamos si las RNPs pueden interactuar entre sí para constituir agregados más complejos.

Cuando las RNPs purificadas de ~30-40 nm de diámetro (Figura 35A, fila 0) fueron incubadas con Ca^{2+} ó Mg^{2+} (2 mM, 2h), los filamentos individuales interactúan entre ellos generando ensamblados parcialmente diméricos de ~70-90 nm de diámetro (Figura 35A, fila 2). A concentraciones de cationes divalentes de 5 mM los filamentos de RNPs se agregan en grandes

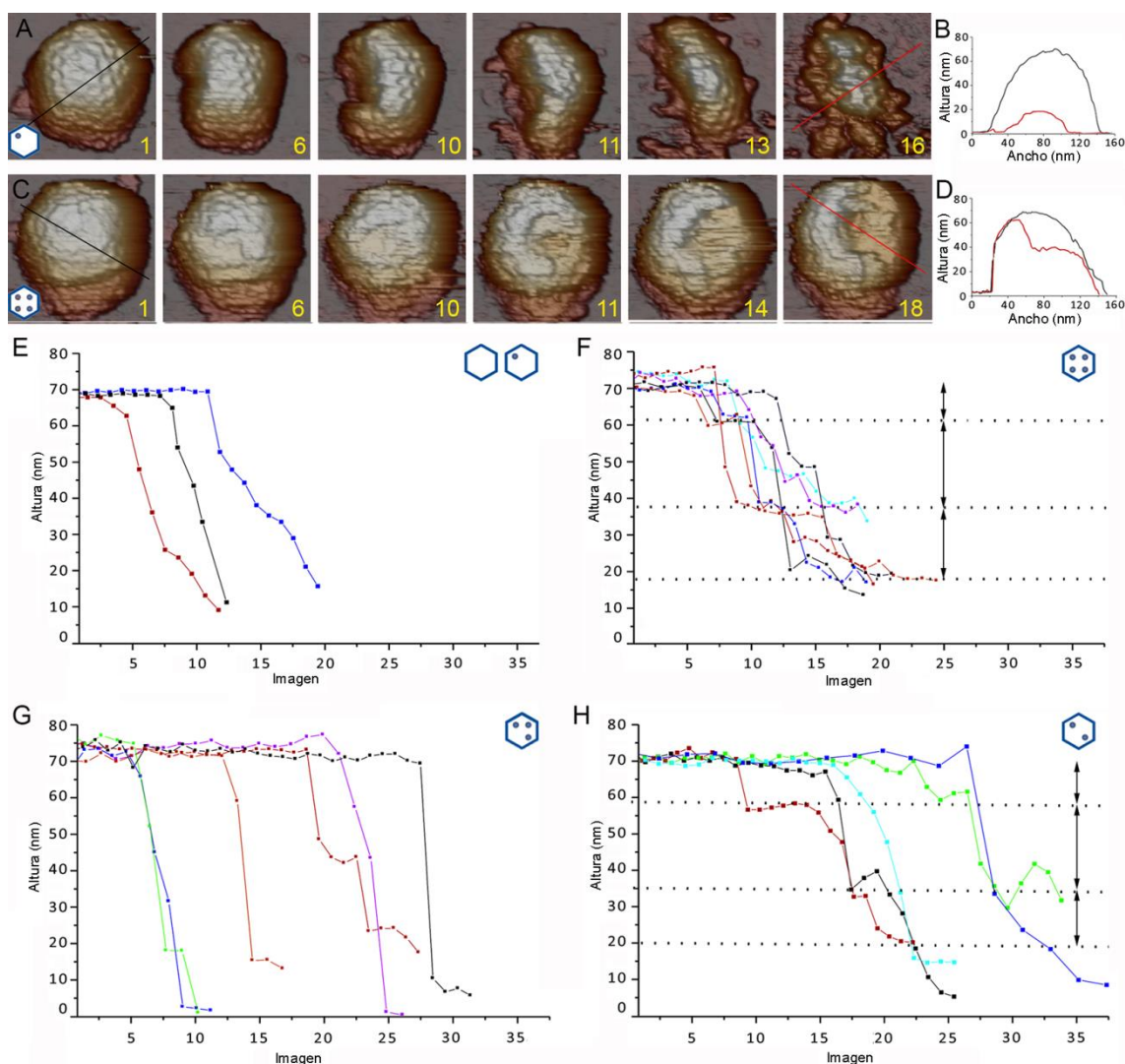


Figura 34. Ruptura de las partículas de las poblaciones de IBDV por fatiga mecánica. (A, C) Selección de imágenes de la ruptura de una partícula individual de las cápsidas (A) E2 y (C) E5. (B, D) Evolución de la altura de la partícula (B) E2 y (D) E5. La partícula E2, inicialmente de ~70 nm de altura (línea negra), cambia a ~15 nm (línea roja); la partícula E5 cambia de ~70 nm de altura (línea negra) a ~60 y ~40 nm (línea roja). (E-H) Cambios topográficos de las partículas de las poblaciones (E) E1-E2, (F) E5, (G) E4 y (H) E3 (H) durante la fatiga mecánica (5-7 partículas para cada población). Los cambios de altura se indican con líneas discontinuas. Mientras que las partículas E1-E2 y E4, que contienen un número impar de RNPs, colapsan rápidamente tras el daño provocado en la cápsida, las partículas E5 y E3, que contienen un número par de RNPs, muestran un comportamiento complejo caracterizado por una ruptura secuencial en varios pasos.

complejos (Figura 35A, fila 5). Cuando los agregados de RNPs obtenidos en presencia de 5 mM $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ se incubaron con concentraciones crecientes desde 5 a 20 mM de EDTA, se recupera la morfología original de filamentos sencillos (~30-40 nm de diámetro) (Figura 35A, filas 5+5, 5+10 y 5+20).

Los filamentos individuales de RNPs (Figura 35A, filas 0 y 5+20) tienen una longitud media de 0.89 ± 0.03 y 0.78 ± 0.03 μm , que se corresponden con un dúplex de RNA de tipo A debido a que

la unión de VP3 al dsRNA no condensa los filamentos (Luque *et al.*, 2009b). Estos resultados son consistentes con la formación reversible de complejos de RNPs, probablemente dímeros, que explicarían el patrón de ruptura en pasos definidos que se produce en viriones maduros (E5-E6), y que podrían desempeñar una función en la maduración y desensamblaje de la cápsida. La formación de agregados de RNPs también se siguió bioquímicamente. Mientras que las RNPs individuales migran tras ultracentrifugación en la zona central de un gradiente discontinuo de glicerol (Figura 35B, arriba), en presencia de 2 mM de cationes divalentes se desplazan hacia la zona inferior del gradiente (Figura 35B, centro), y en presencia de 5mM se localizan en la primera fracción del gradiente (Figura 35B, abajo).

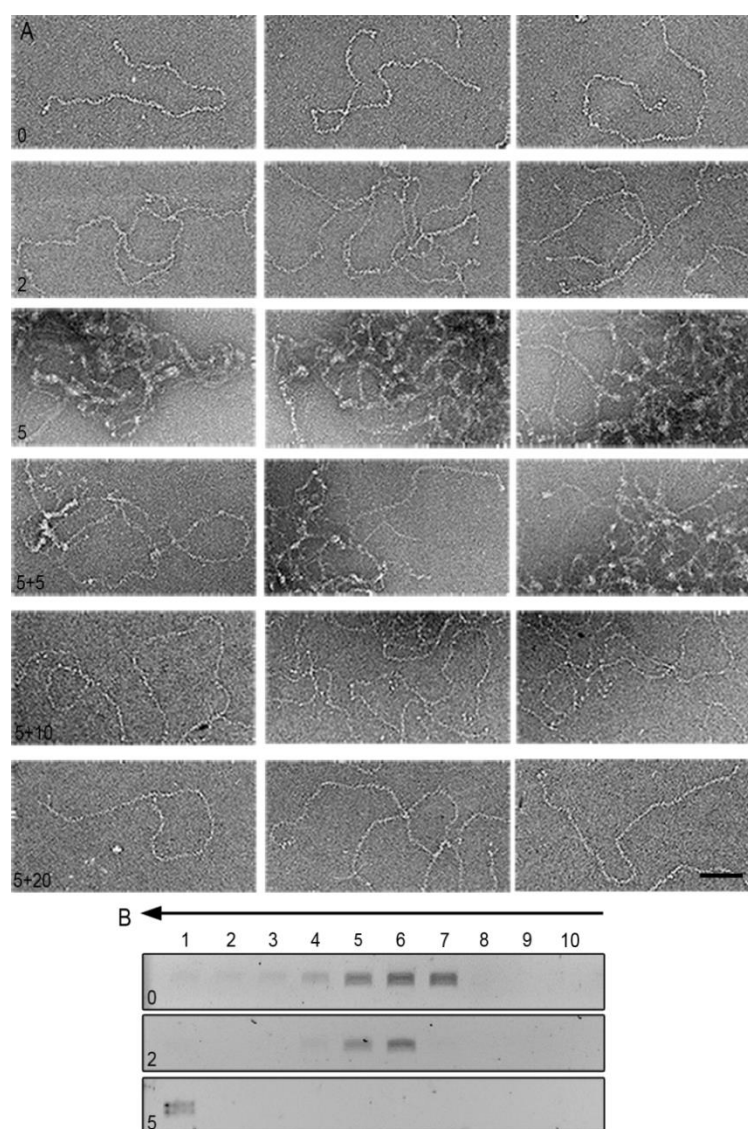


Figura 35. Análisis de la formación reversible de agregados de RNPs en presencia de cationes divalentes. (A) Análisis por ME y tinción negativa de RNPs incubadas durante 2 h a 21°C con (0) 0 mM, (2) 2 mM o (5) 5 mM CaCl₂. RNPs incubadas con 5 mM CaCl₂ fueron incubadas 2 h a 21°C con (5+5) 5 mM, (5+10) 10 mM o (5+20) 20 mM EDTA. La barra de escala corresponde a 100 nm. (B) Análisis en geles nativos de agarosa y tinción con BrEt de las fracciones obtenidas tras someter a ultracentrifugación en gradientes discontinuos de glicerol las muestras de RNPs incubadas durante 2 h con (0) 0 mM, (2) 2 mM y (5) 5 mM de CaCl₂. La flecha superior en el gradiente indica la dirección de sedimentación.

5. Discusión

El ensamblaje y maduración de la cápsida viral constituye un excelente sistema para el estudio de los mecanismos que controlan la dinámica de los complejos macromoleculares formados por la combinación de múltiples proteínas y ácidos nucleicos (Steven *et al.*, 2005). El programa genético de los virus está dirigido para la producción de múltiples copias de partículas infecciosas, aunque la relación de partículas infectivas *versus* partículas defectivas durante el ciclo replicativo varía desde 1 de cada 10 a 1 de cada 10,000 (Carpenter *et al.*, 2009; van der Schaar *et al.*, 2007).

El ensamblaje de la cápsida puede producirse mediante autoensamblaje de las proteínas de la cápsida o a través de la participación de componentes adicionales como proteínas de andamiaje o ácidos nucleicos (Mateu, 2013). El genoma viral, en combinación con las proteínas de andamiaje, puede determinar la nucleación de las subunidades estructurales de la cápsida. En muchos virus ssRNA y algunos dsDNA como el SV40, la cápsida se autoensambla alrededor del genoma mediante interacciones electrostáticas que se producen entre las cargas positivas de las proteínas de la cápsida y las cargas negativas del ácido nucleico (Perlmutter y Hagan, 2015), en muchas ocasiones localizadas en posiciones simétricamente equivalentes (Schneemann, 2006). La estructura de estas regiones ordenadas ha sido visualizada a alta resolución como dúplex de RNA. La longitud óptima del genoma viene determinada por las relaciones entre cargas, tamaño y volumen de la cápsida y estructura del RNA (Perlmutter *et al.*, 2013; Zandi y van der Schoot, 2009). Las predicciones de estructura secundaria sugieren que el RNA viral presenta una estructura terciaria compacta que podría promover el ensamblaje alrededor del mismo (Yoffe *et al.*, 2008). Además, ácidos nucleicos modificados con características no favorables son capaces de dirigir el ensamblaje de cápsidas morfológicamente aberrantes (Zlotnick *et al.*, 2013).

En otros sistemas virales el ensamblaje de la cápsida está acompañado por un proceso de maduración que ocurre después del ensamblaje. En virus complejos las subunidades estructurales se asocian formando un intermediario metaestable, la procápsida, que generalmente requiere la acción de múltiples copias de una o varias proteínas de andamiaje (factor morfogenético). Una vez finalizado el ensamblaje de la procápsida, el genoma es empaquetado, como ocurre en muchos bacteriófagos y algunos virus dsDNA (herpesvirus). Después de producirse determinados cambios conformacionales, irreversibles al ser desencadenados por proteasas (factor desencadenante), la procápsida da lugar a los viriones infectivos. El análisis de estos factores moleculares es necesario para desarrollar estrategias que inhiben el ensamblaje viral o lo dirijan a la formación de estructuras aberrantes no infectivas (Zlotnick *et al.*, 2007).

La cápsida T=13 de IBDV (Coulibaly *et al.*, 2005; Saugar *et al.*, 2005) está formada por trímeros de VP2 que se encuentran dispuestos en cinco conformaciones distintas (a-e). Esta flexibilidad conformacional se debe a un factor intrínseco, la hélice anfipática $\alpha 5$ del extremo carboxilo terminal de pVP2, que actúa como interruptor molecular en el polimorfismo estructural durante el ensamblaje (Saugar *et al.*, 2005). Numerosas evidencias experimentales indirectas indican que la proteína estructural mayoritaria VP3 también participa en el polimorfismo estructural de (p)VP2 actuando como proteína de andamiaje (Saugar *et al.*, 2010). (Villanueva *et al.*, 2004).

La infección de células aviares con IBDV genera de manera natural hasta (al menos) seis poblaciones virales, E1-E6, en función de su contenido genómico. Las poblaciones E1-E3 contienen 0, 1 y 2 moléculas de dsRNA, respectivamente, mientras que las poblaciones E4-E6 (~80% de las partículas totales) puede contener más de un genoma completo. Las poblaciones E5-E6 (~64% de las partículas totales) contienen 4 moléculas de dsRNA y tienen la mayor capacidad replicativa, con una relación partícula/pfu de ~6 (Luque *et al.*, 2009a). En este trabajo hemos analizado mediante crioTE y AFM las partículas virales poblaciones de IBDV y, más en detalle mediante crioME, la población E1. Las moléculas de dsRNA encapsidadas en el interior de los viriones se encuentran como RNPs, que han sido analizadas funcional y estructuralmente. La proteína VP3 está implicada en el ensamblaje de la cápsida, en la formación y actividad de las RNPs y en la estabilidad mecánica de la cápsida de IBDV.

5.1 VP3 como proteína de andamiaje durante el ensamblaje de la cápsida de IBDV

Nuestros análisis indican que la cápsida E1 vacía representa un estadio similar a la procápsida de IBDV. Las partículas E1 de IBDV no contienen dsRNA y probablemente se trate de una cápsida abortiva en el proceso de ensamblaje y maduración del virus, en la que hemos visualizado por primera vez a VP3 como una proteína de andamiaje genuina. La existencia de al menos tres estadios de maduración en función de la organización de VP3 en el interior de la cápsida y de la intensidad de las conexiones entre pVP2/VP2 y VP3 pone de manifiesto la modulación de la función de VP3 a lo largo del ciclo viral (Figura 36). En las primeras etapas del ensamblaje las conexiones entre pVP2/VP2 y VP3 son numerosas y VP3 estabiliza a una cápsida T=13 inmadura e inestable (cápsida E1-1A), cuya resolución es limitada. Una vez ensamblada la cápsida T=13 con una cierta estabilidad estructural, las conexiones de VP3 con la superficie interna de la cápsida T=13 van disminuyendo (cápsida E1-1B), hasta un estadio final en el que la mayoría de VP3 se encuentra distribuida de manera homogénea en el volumen interno, sin interacciones directas con la superficie interna de la cápsida (cápsida E1-2). Los últimos cinco residuos de la región carboxilo terminal de VP3, ²⁵⁵DEDLE²⁵⁹, (denominado

factor de activación) interaccionan de manera temporal con la región ⁴⁴³GFKDIIRAIR⁴⁵² de la hélice α anfipática de pVP2 (Saugar *et al.*, 2010). El extremo C-terminal de VP3 está precedido por una región de carácter básico, rica en Arg y Lys, que también juega un papel importante ya que mutaciones de los residuos de Arg alteran el ensamblaje de la cápsida T=13 (Irigoyen *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que existen al menos dos modos de interacción de la proteína VP3: uno dedicado a la modulación del polimorfismo estructural de VP2, y el otro implicado en la estabilización de la procápsida y/o impidiendo el ensamblaje de estructuras abortivas. En este sentido, VP3 es similar a las proteínas de andamiaje los fagos P22 (*Salmonella*) y ϕ X174 (*E. coli*) (Fane y Prevelige, 2003). El análisis de la población E1 y su clasificación en las partículas E1-1A, E1-1B y E1-2 sugiere que, como la propia procápsida metaestable, las conexiones entre VP3-pVP2 se deben a interacciones débiles y dinámicas que se rompen espontáneamente (como se detecta en las cápsidas E1-1B o E1-2). La existencia de siete u ocho conexiones en cada subunidad asimétrica supone un total de 420-480 conexiones en la cápsida, en línea con el número medio de moléculas de VP3/virión en las poblaciones E2-E6, de ~450 copias (Luque *et al.*, 2009a). Estos cálculos suponen una relación molar (p)VP2:VP3 de 1.7. La procápsida T=7 del fago P22, constituida por la proteína gp5, puede contener hasta ~300 copias de la proteína de andamiaje (gp8) (Chen *et al.*, 2011; Prevelige *et al.*, 1988), lo que supone una relación molar gp5:gp8 de 1.4, en un rango similar al de IBDV.

Cuando la formación *in vivo* de la procápsida ha concluido, VP3 es liberada y finaliza su función de andamiaje después del procesamiento de la región carboxilo terminal de pVP2 por VP4 (Sánchez y Rodríguez, 1999), la proteasa celular PurSA (Irigoyen *et al.*, 2012) o la propia VP2 durante la maduración del virus (Irigoyen *et al.*, 2009). A continuación VP3 comienza su función como nucleoproteína unida al dsRNA en el virión maduro (Luque *et al.*, 2009b) y activador de VP1 (Ferrero *et al.*, 2015a; Garriga *et al.*, 2007). Por tanto, otro factor que puede jugar un papel determinante en este proceso es el propio genoma viral cuando interacciona con VP3. En el virus de la gripe y en los fagos ϕ 6 y ϕ 12, los diferentes segmentos genómicos son encapsidados gracias a la presencia de señales específicas de empaquetamiento y la interacción entre ellos (Essere *et al.*, 2013; Fournier *et al.*, 2012; Huiskonen *et al.*, 2006). El empaquetamiento del genoma viral en BTV ocurre mediante la formación de complejos entre los correspondientes ssRNAs con estructuras secundarias específicas, que permiten el reconocimiento secuencial y unidireccional de los distintos segmentos genómicos (10 en total) y con ello asegurar que cada partícula individual contenga un genoma completo (Fajardo *et al.*, 2015; Sung y Roy, 2014). Sin embargo en IBDV el empaquetamiento es inespecífico y los dos segmentos son encapsidados de manera aleatoria (Luque *et al.*, 2009a).

En viriones de IBDV (E2-E6) el número de moléculas de VP3 es ~450, independientemente del número de segmentos de dsRNA empaquetados (Luque *et al.*, 2009a). La incorporación de VP3 por tanto está determinada principalmente por su función como proteína de andamiaje durante el ensamblaje de proteínas de la cápsida inmaduras (pVP2) en la procápsida (Saugar *et al.*, 2010). En nuestro modelo de ensamblaje de la cápsida T=13, la interacción entre pVP2 y VP3 retrasa el procesamiento rápido por parte de PurSA del dominio carboxilo terminal de pVP2, y los trímeros de pVP2 se ensamblan mayoritariamente en hexámeros evitando la tendencia natural de VP2 a formar únicamente pentámeros (y originar subpartículas virales T=1). Este modelo es consistente con otros análisis estructurales que muestran que la hélice anfipática $\alpha 5$ adopta dos conformaciones, formando un haz de cinco hélices en los pentámeros (estado cerrado) o una conformación abierta en forma de estrella en los hexámeros (Luque *et al.*, 2007). En los diferentes estados de ensamblaje caracterizados en la población E1, sobre todo en la cápsida E1-1A, las conexiones entre pVP2 y VP3 se mantienen localizadas en el centro de las posiciones pentaméricas y en los trímeros de (p)VP2 que forman parte de los hexámeros.

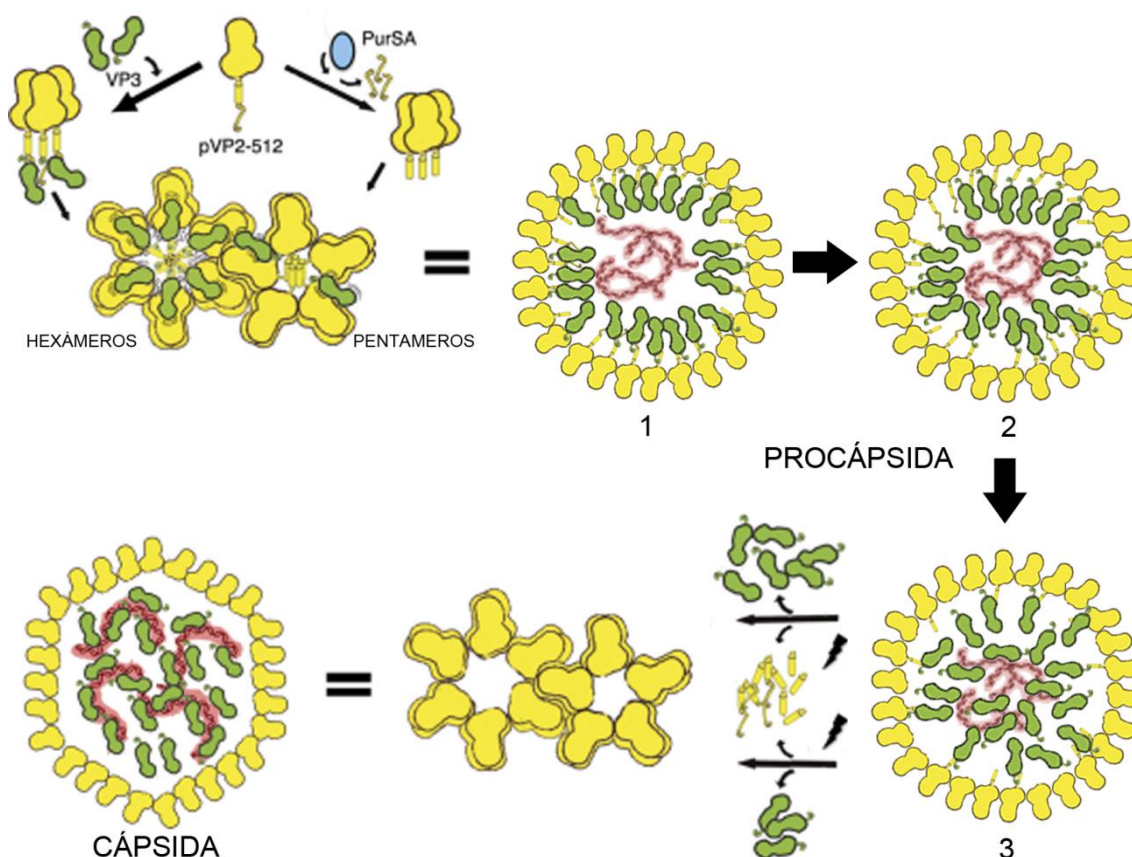


Figura 36. Modelo para el ensamblaje de la cápsida T=13 de IBDV a través de la formación de una procápsida. La procápsida de IBDV pasa por tres estadios de hasta generar la cápsida del virión maduro: (1) cápsida E1-1A: VP3 actúa como andamiaje de la cápsida T=13 inmadura e inestable y las conexiones entre pVP2/VP2 y VP3 son intensas; (2) cápsida E1-1B: VP3 abandona progresivamente su función de andamiaje, probablemente por la unión al dsRNA, y las conexiones entre pVP2/VP2 y VP3 se debilitan y/o disminuyen; (3) cápsida E1-2: la mayor parte de VP3 está interaccionando con el genoma y se encuentra distribuida de manera homogénea en el volumen interno.

La estructura atómica de VP3 resuelta por cristalografía de rayos X comprende aproximadamente la mitad (residuos T92-H220) de la secuencia completa de la proteína (Casañas *et al.*, 2008). Esta región se basa en dos dominios de α -hélices conectados por un lazo flexible en forma de bisagra y se encuentra organizada como un dímero. La ausencia de los extremos amino y carboxilo terminal en la estructura resuelta refleja la elevada flexibilidad intrínseca de los mismos. La densidad interna de VP3 localizada en la procápsida (cápsida E1-1A) carece de simetría icosaédrica y probablemente constituya una estructura de aspecto micelar que comparte muchas similitudes con la procápsida de los herpesvirus. Durante el ensamblaje de la cápsida T=16 de los herpesvirus, además de la acción de las proteínas de andamiaje externas VP23 y VP19C (Aksyuk *et al.*, 2015), se forma una estructura de andamiaje interna con dímeros de la proteína de andamiaje preVP22a y el precursor de la proteasa viral VP24-VP21 que estabilizan la procápsida durante el ensamblaje, donde VP22 y VP21 tienen la misma secuencia (Cardone *et al.*, 2012). VP24 se autoproteoliza y procesa la región C-terminal de VP21 y preVP22a provocando la liberación de las interacciones de VP22a y VP21 con la proteína mayoritaria de la cápsida VP5. La proteasa también degrada a VP22a y comienza la encapsidación del genoma para dar lugar a la cápsida madura o cápsida C. La procápsida E1-1A de IBDV es equivalente a la partícula abortiva del ensamblaje de herpesvirus denominada cápsida B, y la partícula E1-2 es similar a la estructura de la cápsida A (Figura 37) que se pueden aislar como resultado de alteraciones en la ruta de ensamblaje. La región C-terminal procesada de VP21 y preVP22a presenta una estructura dimérica rica en α -hélices organizada como una doble espiral (Pelletier *et al.*, 1997). La estructura cristalográfica de la proteína de andamiaje del fago ϕ 29 también presenta una estructura de doble espiral dimérica (Morais *et al.*, 2003).

IBDV, y los birnavirus en general, comparten muchas características y estrategias con virus ssRNA de polaridad positiva y negativa. Mientras que el plegamiento de la proteína de la cápsida VP2 (así como su actividad autoproteolítica) es muy similar a la de los nodavirus, VP1 es similar a la RdRp de los tetravirus, y la organización del genoma como RNPs es común entre virus (-) ssRNA, el ensamblaje de una procápsida con la implicación transitoria de una proteína de andamiaje interna es típica de virus dsDNA (bacteriófagos y herpesvirus). Considerando la estrategia de ensamblaje de la cápsida, IBDV representa un nexo de unión entre los linajes virales de los virus dsRNA y dsDNA (Abrescia *et al.*, 2012).

5.2 Estabilidad mecánica de la cápsida de IBDV mediada por RNPs

Nuestros análisis indican que un incremento en el contenido genómico de los viriones supone un incremento en la rigidez de la cápsida. Los ácidos nucleicos virales tienen un papel

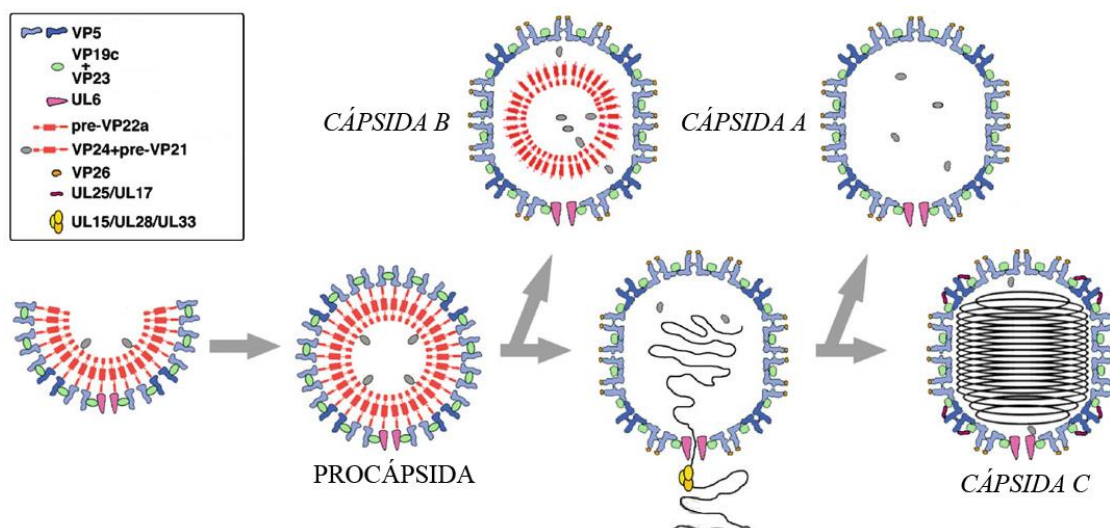


Figura 37. Ruta de ensamblaje de la cápsida de herpesvirus. El ensamblaje de la procápsida comienza en la proteína portal (UL15/UL28/UL33). Ésta sirve de punto de nucleación para el ensamblaje de la proteína de la cápsida (VP5), con la ayuda de las proteínas de andamiaje externas (VP19C+VP23) e internas (pre-VP22a y VP24+pre-VP21). La proteasa (VP24), activada tras su liberación de la poliproteína (VP24+pre-VP21), procesa la proteína interna de andamiaje, que es liberada durante el empaquetamiento del DNA. En esta etapa se produce un cambio conformacional de la cápsida que crea sitios de unión para proteínas accesorias (VP26) en las posiciones hexaméricas. Una vez finalizado el empaquetamiento del material genómico, se produce otro cambio conformacional que promueve la unión del heterodímero UL17/UL25. Las cápsidas A y B son partículas abortivas producidas como consecuencia de alteraciones en etapas tempranas de la ruta de ensamblaje (adaptado de Cardone *et al.*, 2012).

estructural en el ensamblaje y estabilización de muchos virus. Los análisis de indentación por AFM de virus dsDNA (fago $\phi 29$) muestran que el dsDNA altamente empaquetado (~ 45 pb/100 nm³, con una elevada presión interna de ~ 40 -60 atm) incrementa la rigidez de la partícula, de manera similar al efecto del aire comprimido en el interior de una pelota de fútbol (Hernando-Pérez *et al.*, 2012). En el virus diminuto del ratón (MVM), el ssDNA interacciona específicamente con residuos localizados en la superficie interna de la cápsida y tiene un efecto reforzante (Carrasco *et al.*, 2006; Carrasco *et al.*, 2008). De manera similar, el virus del triatoma, un virus ssRNA con una densidad de empaquetamiento mayor que los fagos $\phi 29$ y λ , muestra interacciones electrostáticas entre el RNA y regiones cargadas positivamente de la superficie interna de la cápsida (Snijder *et al.*, 2013). En las partículas de la población E5 de IBDV (con una densidad del dsRNA de ~ 20 pb/100 nm³), el incremento del número de RNPs empaquetadas se corresponde con una mayor rigidez mecánica. Las RNPs estabilizan la cápsida y ayudan a mantener su integridad estructural, incluso cuando se pierden algunos cápsomeros. En este contexto es interesante resaltar los análisis comparativos de nanoindentación mediante AFM de las partículas de la población E1 y las SVPs T=1. Las cápsidas T=13 de la población E1 y las cápsidas T=1 tienen constantes de elasticidad similares a pesar de las grandes diferencias en tamaño, ~ 70 nm versus ~ 26 nm (comunicación personal, Dr. Johann Mertens, IMDEA). Experimentos de simulación de AFM para modelos discretos de las cápsidas T=13 y

T=1 indican que la cápsida T=13 requiere un grosor extra de ~3.5 nm para que la rigidez de ambas estructuras sea similar (comunicación personal, Dr. David Reguera, Universidad de Barcelona). Estos análisis son consistentes con nuestros resultados de criOTE y criOME respecto a la existencia de una capa interna de VP3 conectada a la cápsida T=13 con una función de andamiaje durante el ensamblaje del virus.

Los ensayos de digestión con RNasa III de RNPs purificadas (Luque *et al.*, 2009b), así como los resultados obtenidos mediante criOME, indican que VP3 se encuentra homogéneamente distribuida a lo largo del dsRNA y permite asumir que probablemente la VP3 unida al dsRNA sea la responsable de la resistencia mecánica de la cápsida de IBDV, aunque el propio dsRNA también podría estar involucrado. VP3 por sí sola o en presencia de ssRNA celular inespecífico (libre o unido al ssRNA), no incrementa la rigidez de la cápsida. Estos resultados implican que VP3 adquiere una conformación competente para la interacción con VP2 únicamente mediante su unión al dsRNA (Figura 38). Estas interacciones VP2-VP3 difieren de las interacciones pVP2-VP3 que ocurren durante el ensamblaje de la procápsida. Las 3DRs de viriones maduros sólo mostraron densidades correspondientes a VP2 sin densidades relacionadas con VP3 (Coulibaly *et al.*, 2005; Luque *et al.*, 2007), sugiriendo que las interacciones VP2-VP3 detectadas por AFM son aleatorias y/o estables pero irregulares.

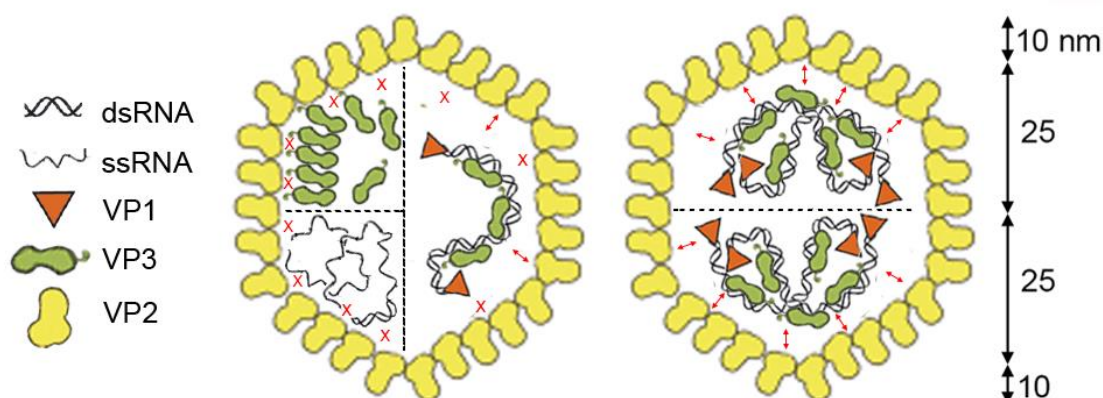


Figura 38. Dímeros de RNPs como unidad básica de estabilización de la cápsida de IBDV. Esquema de la cápsida de IBDV y los componentes estructurales implicados en su estabilización. Cuando VP3 está actuando como andamiaje o “soluble” en el interior de la cápsida (VLPs vacías, poblaciones E1 y E2), o en presencia de ssRNA (VLPs llenas), los contactos con VP2 (X rojas) son débiles o inexistentes. En presencia de dsRNA, los contactos son más intensos (flechas rojas), probablemente porque la unión de VP3 al dsRNA le permite adquirir la conformación correcta para establecer una interacción más fuerte con VP2 (izquierda). Los viriones maduros de IBDV (poblaciones E5 y E6) son poliploides y tienen empaquetados cuatro segmentos de dsRNA organizados como RNPs en su interior. En este caso, las RNPs están organizadas formando dímeros; en este estado oligomérico, VP3 adquiere una conformación que le permite establecer interacciones fuertes con la superficie interna de la cápsida. Esta organización estructural del genoma explica el comportamiento de ruptura en pasos definidos observado en los experimentos de fatiga mecánica (el grosor de la capa viral es ~10 nm según análisis previos mediante criOME tridimensional).

El análisis del contenido de RNPs de las poblaciones de IBDV mediante electroforesis en geles nativos de agarosa indica que VP3 está unida al dsRNA en una relación constante debido a que se detectan bandas definidas que se corresponden con el segmento A y B (Luque *et al.*, 2009b). De manera indirecta, la estequiometría de VP3 implica que muchas moléculas de VP3 no se encuentran unidas al dsRNA en las poblaciones E2-E4, permaneciendo como proteínas solubles en el interior de la cápsida (en su totalidad en las poblaciones E1-1B y E1-2). El estudio de mutantes de VP3 que afecten parcialmente la estabilidad de la cápsida sin alterar otras funciones como la unión al dsRNA permitiría identificar las regiones de VP3 involucradas en la estabilización de la cápsida después del ensamblaje.

Los experimentos de fatiga mecánica nos han permitido obtener información sobre la ruta de desensamblaje del virus que garantiza una infección satisfactoria (Ortega-Esteban *et al.*, 2013). Las diferentes poblaciones de IBDV fueron sometidas a secuencias de fuerzas constantes para inducir la modificación gradual de la estructura molecular de los viriones. Los resultados derivados de estos análisis mostraron la existencia de dos patrones de ruptura distintos, continuo en un único paso o discontinuo en pasos definidos. Las partículas de las poblaciones E5-E6 empaquetan cuatro RNPs y se fragmentan en tres pasos; tras la eliminación de un número de capsómeros, un fragmento de la cápsida T=13 es eliminado y queda expuesto el núcleo interno de RNPs. A continuación se pierde la mitad superior del núcleo interno, seguido de la mitad inferior. La disposición del núcleo interno (4 RNPs) en dos mitades sería consistente con la organización de las RNPs en dos dímeros en el interior de la cápsida. La interacción progresiva entre RNPs fue observada *in vitro* variando la concentración de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. La estructura atómica de la región central de VP3, basada en dos dominios de α -hélices conectados por un lazo flexible en forma de bisagra, se encuentra organizada como un dímero (Casañas *et al.*, 2008). El potencial electrostático de las regiones conectadas del dímero de VP3 muestra zonas cargadas negativamente que podrían ser neutralizadas por cationes divalentes o altas concentraciones de sal.

Las partículas de las poblaciones E3 y E5-E6 mostraron un comportamiento similar en los experimentos de fatiga mecánica; todas presentan un número par de RNPs que podrían asociarse en uno o dos dímeros, respectivamente. La población E4, que empaqueta tres RNPs, sigue un comportamiento lineal de ruptura en un único paso; esta similitud con las poblaciones E1-E2 sugiere que la presencia de una molécula individual de RNP no favorece una situación óptima para la formación de dímeros de RNPs. Estos datos muestran la diferencia entre rigidez y ductilidad estructural; mientras que las cápsidas E4 son más rígidas que las E3, sin embargo son menos resistentes a fatiga mecánica, debido a que el efecto estabilizador de las RNPs se ve

reducido. Estos resultados sugieren que la función estabilizadora de la cápsida está mediada por dímeros de VP3 establecidos por la interacción entre moléculas individuales de RNPs.

Los estudios de IBDV mediante AFM, en combinación con análisis estructurales previos mediante crioME tridimensional y cristalografía de rayos X, muestran una correlación directa entre la rigidez mecánica de la cápsida de IBDV y el número de RNPs incorporadas en ella. Estas características podrían estar determinadas por oligómeros de RNPs y tener importantes implicaciones en el ciclo viral.

5.3 Análisis de VP3 y VP1 como componentes esenciales de las RNPs de IBDV

Las proteínas virales que interaccionan con ácidos nucleicos para llevar a cabo la selección, empaquetamiento y/o condensación dentro de las cápsidas virales son relativamente comunes en las diferentes familias virales. Además de la función de andamiaje durante el ensamblaje de IBDV, VP3 también actúa como proteína de unión al dsRNA viral generando RNPs (Luque *et al.*, 2009b; Pedersen *et al.*, 2007; Tacken *et al.*, 2002). La formación de RNPs con moléculas de dsRNA es una característica distintiva de los birnavirus ya que no ha sido descrita en ningún otro virus dsRNA. La estequiometría de VP3 en las cápsidas E2-E6 es de ~450 copias, independientemente del número de segmentos de dsRNA incorporados (Luque *et al.*, 2009a), lo que implica que, si la unión de VP3 al dsRNA es a saturación, en las poblaciones E5-E6 con cuatro segmentos de dsRNA habría ~112 moléculas de VP3/molécula dsRNA, o una molécula de VP3/26 pb o, lo que es lo mismo, 1 molécula de VP3 cada ~73 Å. Estas estimaciones son consistentes con el análisis mediante crioME de RNPs funcionalmente activas que indica que los filamentos de dsRNA están recubiertos homogéneamente por monómeros de VP3 con una separación de ~71 Å entre moléculas adyacentes.

La reconstitución del complejo VPg-dsRNA obtenido en condiciones nativas con VP3 muestra la recuperación gradual del número de moléculas de VP3 unidas no covalentemente al dsRNA. Las RNPs reconstituidas llevan asociado un incremento de la actividad de síntesis de RNA en ausencia de la cápsida hasta alcanzar niveles similares a los obtenidos con las RNPs nativas. La funcionalidad de las RNPs nativas o reconstituidas también quedó demostrada en los experimentos de transfección de células aviares donde se recuperó una progenie viral competente. El recubrimiento homogéneo de VPg-dsRNA con VP3 para restablecer la funcionalidad de las RNPs sugiere que las interacciones entre VP1 y VP3 son necesarias durante la replicación y transcripción del genoma viral. De hecho, la región C-terminal de VP3 es un activador transcripcional que introduce cambios conformacionales en un lazo de VP1 que bloquea el sitio activo de la polimerasa (Garriga *et al.*, 2007). Estos resultados nos permiten

plantear la hipótesis de un deslizamiento de VP1 a lo largo de la RNP, donde cada molécula de VP3 repite su mecanismo de activación a medida que avanza sobre el dsRNA. En adenovirus, la proteasa viral está asociada al dsDNA hasta que se encuentra con el precursor de la proteína VI (pVI), que lo procesa generando un segmento de 33 residuos del extremo N-terminal y un segmento de 11 residuos del extremo C-terminal (pVIc) de la proteína VI. El segmento pVIc se une a la proteasa y permite su deslizamiento a lo largo del dsDNA, que se encuentra formando adenosomas (dsDNA asociado a la nucleoproteína pVII), con el consiguiente procesamiento de otros precursores virales que también se encuentran unidos al dsDNA (Mangel y San Martín, 2014). En virus (-) ssRNA, la interacción entre la polimerasa viral y la nucleoproteína es esencial para estimular la actividad de síntesis de RNA y la procesividad de la polimerasa durante la replicación del genoma (Honda *et al.*, 1988; Morin y Schaeffer, 2012; Portela y Digard, 2002).

Los birnavirus carecen de la nucleocápsida T=2 conservada en los demás virus dsRNA, por lo que las RNPs deben realizar manera eficiente las funciones específicas relacionadas con la replicación y transcripción del genoma viral, así como con el silenciamiento del RNAi (Luque *et al.*, 2009b; van Cleef *et al.*, 2014). Esta característica estructural, aunque no se ha observado en otros virus dsRNA, es similar a las nucleoproteínas de determinados virus dsDNA. Las partículas icosaédricas de poliomavirus y papovavirus contienen en su interior una estructura cromosómica compuesta por el dsDNA circular estructurado en nucleosomas por histonas celulares (Fanning y Zhao, 2009; Pawlita *et al.*, 1996). La organización genómica de adenovirus es similar pero el dsDNA lineal se encuentra condensado por sus propias proteínas virales formando adenosomas (Pérez-Berná *et al.*, 2015).

La organización del genoma viral en RNPs es, sin embargo, común entre los virus (-) ssRNA (Ortín y Martín-Benito, 2015). Mientras que en los virus con genoma no segmentado las nucleoproteínas están organizadas siguiendo una conformación helicoidal, lineal y rígida (Schoehn *et al.*, 2004; Tawar *et al.*, 2009), en los virus con genoma segmentado es circular y flexible (Raymond *et al.*, 2010). En los virus con genoma no segmentado las interacciones intermonoméricas implican únicamente las regiones flexibles amino y/o carboxilo terminal de las nucleoproteínas (Arranz *et al.*, 2012). En los virus con genoma segmentado, la región flexible de un monómero (el extremo amino terminal en los bunyavirus) establece interacciones con la región central (cuerpo) del monómero consecutivo (Ferron *et al.*, 2011). En los bunyavirus, esta flexibilidad provoca la formación de una estructura sin simetría aparente (Pettersson y von Bonsdorff, 1975), similar a lo que ocurre en las RNPs de IBDV. Además, el genoma no segmentado contiene la fosfoproteína, un factor viral esencial en la transcripción y replicación

del genoma. Las fosfoproteínas presentan una estructura alargada en la que se alternan dominios ordenados y estables con regiones desordenadas y flexibles, y tienen capacidad de oligomerización (Habchi *et al.*, 2010). La estructura de VP3 de IBDV presenta una organización similar a las nucleoproteínas de los virus (-) ssRNA no segmentados, donde la región central representaría el núcleo estable y ordenado y los extremos amino y carboxilo terminal estarían implicados en las interacciones entre monómeros gracias a su desorden y/o flexibilidad intrínsecos. El extremo carboxilo terminal de VP3 es una región hidrofílica, flexible y desordenada, que está implicado en la modulación del polimorfismo de VP2 durante el ensamblaje de la cápsida de IBDV, y en la interacción con VP1 (Maraver *et al.*, 2003b; Tacken *et al.*, 2002; Tacken *et al.*, 2000) y su consiguiente incorporación en el interior de los viriones (Bahar *et al.*, 2013; Lombardo *et al.*, 1999).

El análisis estructural de los extremos de las RNPs de IBDV indica la presencia de una o dos moléculas de VP1 en cada extremo 5' del dsRNA, y una de ellas unida covalentemente al filamento de RNP que se corresponde a VPg (RNPs con la disposición "1+1"). Estudios previos indican que VP1 es capaz de sintetizar cadenas de ssRNA y permanece unida covalentemente al extremo 5' de las cadenas de nueva síntesis en su forma VPg (Graham *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2009b). Es posible que sobre VPg se uniera una molécula de VP1 soluble, que llevaría a cabo la síntesis de RNA en un proceso semiconservativo (Dobos, 1995). Esta disposición natural se correspondería con las RNPs "1+2" y "2+2". La formación de dímeros de RdRp (incluso oligómeros), se ha descrito en virus (+) ssRNA (Cevik, 2013; Chinnaswamy *et al.*, 2010; Ferrero *et al.*, 2015b; Hogbom *et al.*, 2009; Spagnolo *et al.*, 2010), en virus (-) ssRNA (Chang *et al.*, 2015), y en virus dsRNA como IPNV (Graham *et al.*, 2011). La formación de dímeros y oligómeros de RdRps puede ser importante como un mecanismo de regulación alostérica, o para incrementar su estabilidad (Ferrer-Orta *et al.*, 2015). En este contexto, la presencia de una molécula de VPg en cada extremo 5' de la doble hebra de RNA sugiere que, dependiendo del extremo donde se une VP1, se sintetiza la cadena complementaria positiva o negativa y, lo que es más interesante, tanto la transcripción (síntesis de cadena positiva) como la replicación (síntesis de cadena negativa) se inician de forma similar. Los análisis bioquímicos de los denominados complejos VPg-dsRNA muestran que también contienen moléculas de VP1, por lo que en los experimentos de síntesis de RNA con RNPs reconstituidas, la actividad polimerasa podría ser realizada por cualquiera de las dos RdRps. Los dímeros de RdRp, o lo que es lo mismo VPg unida a VP1, deben ser más estables que la unión de VP3 a lo largo del filamento de dsRNA. Futuros estudios están encaminados a resolver esta ambigüedad, así como la estequiometría de VPg, al menos en la población E5-E6.

IBDV proporciona un sistema relativamente sencillo para el estudio de las bases moleculares que determinan la multifuncionalidad de la proteína VP3, y su capacidad para realizar actividades distintas de manera simultánea como la unión al dsRNA y la estabilización mecánica de la cápsida. Los factores que controlan esta multifuncionalidad pueden ser variados. La interacción de VP3 con (p)VP2, VP1 o el dsRNA podría inducir cambios conformacionales específicos para cada ligando, así como el estado oligomérico de VP3. La estructura cristalográfica resuelta de VP3 es un dímero de la región central (T92-H220) (Casañas *et al.*, 2008) que podría tener su relevancia *in vivo*. Por ejemplo en la dimerización de las RNPs, detectada indirectamente en los experimentos de fatiga mecánica, y visualizada por ME cuando las RNPs son incubadas en presencia de cationes divalentes (2 mM Ca^{2+} ó Mg^{2+}). Los ensayos de actividad de las RNPs (nativas o reconstituidas) también se realizan en condiciones de dimerización de la VP3, en presencia de 4 mM Mg^{2+} , necesario para la actividad polimerasa de VP1. Alternativamente, los dímeros de VP3 podrían ser relevantes para su actividad como proteína de andamiaje. Otros factores implicados pueden ser debidos a modificaciones de VP3 (por ejemplo fosforilaciones), estados plegados/desestructurados de sus extremos amino y/o carboxilo, concentraciones locales en el viroplasma de pequeños ligandos, o una combinación de éstos. El conocimiento de las estructuras atómicas de los extremos amino y o carboxilo de VP3, bien por sí mismos o solapados a la región central, contribuirá a una mejor comprensión de los interruptores moleculares que controlan su multifuncionalidad.

Las proteínas virales como VP3 representan el candidato potencial más adecuado para el diseño de fármacos debido a que un único compuesto podría interferir con múltiples funciones a lo largo del ciclo viral.

6. Conclusiones

1. La proteína multifuncional VP3 se ha visualizado directamente como proteína de andamiaje durante el ensamblaje de la procápsida de IBDV a partir del análisis estructural de la población viral E1. Las partículas E1 representan procápsidas T=13, carentes de genoma viral (abortivas), en las que se definen las interacciones entre pVP2/VP2 y VP3, localizadas en las posiciones pentaméricas y hexaméricas.
2. Los complejos VPg-dsRNA obtenidos en condiciones nativas están constituidos por el dsRNA viral y las proteínas VPg y VP1. Estos complejos son reconstituidos con VP3 para formar complejos ribonucleoproteicos, RNPs, similares a las RNPs originales del virus. Las RNPs reconstituidas son competentes para la síntesis de RNA en ausencia de la cápsida T=13 de VP2. La transfección de células aviares con RNPs nativas o reconstituidas permite recuperar una progenie viral competente.
3. Las RNPs de IBDV son estructuras filamentosas sin simetría helicoidal recubiertas homogéneamente por monómeros de VP3 con una separación de ~ 73 Å entre moléculas adyacentes. Los extremos de las RNPs presentan una o dos moléculas de VP1/VPg.
4. El análisis mecánico de las poblaciones de IBDV indica que los viriones con mayor contenido en RNPs, que se correlacionan con una mayor infectividad, tienen una cápsida más rígida. Esta rigidez está mediada por VP3 unida al dsRNA. Los contactos de VP2 con VP3 establecidos en la cápsida madura (E5-E6) son distintos de las interacciones iniciales durante el ensamblaje de la procápsida (E1). Los dímeros de RNPs son las unidades básicas de estabilización del virión.

7. Bibliografía

Abrescia, N. G., Bamford, D. H., Grimes, J. M. y Stuart, D. I. (2012). Structure unifies the viral universe. *Annu Rev Biochem*, 81, 795-822.

Aksyuk, A. A., Newcomb, W. W., Cheng, N., Winkler, D. C., Fontana, J., Heymann, J. B. y Steven, A. C. (2015). Subassemblies and asymmetry in assembly of herpes simplex virus procapsid. *MBio*, 6(5), e01525-01515.

Ang, D., Keppel, F., Klein, G., Richardson, A. y Georgopoulos, C. (2000). Genetic analysis of bacteriophage-encoded cochaperonins. *Annu Rev Genet*, 34, 439-456.

Antin, P. B. y Ordahl, C. P. (1991). Isolation and characterization of an avian myogenic cell line. *Dev Biol*, 143(1), 111-121.

Arnott, S., Hukins, D. W. y Dover, S. D. (1972). Optimised parameters for RNA double-helices. *Biochem Biophys Res Commun*, 48(6), 1392-1399.

Arranz, R., Coloma, R., Chichon, F. J., Conesa, J. J., Carrascosa, J. L., Valpuesta, J. M., Ortín, J. y Martín-Benito, J. (2012). The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science*, 338(6114), 1634-1637.

Bahar, M. W., Sarin, L. P., Graham, S. C., Pang, J., Bamford, D. H., Stuart, D. I. y Grimes, J. M. (2013). Structure of a VP1-VP3 complex suggests how birnaviruses package the VP1 polymerase. *J Virol*, 87(6), 3229-3236.

Baker, T. S., Olson, N. H. y Fuller, S. D. (1999). Adding the Third Dimension to Virus Life Cycles: Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Viruses from Cryo-Electron Micrographs. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(4), 862-922.

Bamford, D. H., Grimes, J. M. y Stuart, D. I. (2005). What does structure tell us about virus evolution? *Curr Opin Struct Biol*, 15(6), 655-663.

Bellamy, A. R. y Joklik, W. K. (1967). Studies on the A-rich RNA of reovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58(4), 1389-1395.

Birghan, C., Mundt, E. y Gorbalenya, A. E. (2000). A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.*, 19(1), 114-123.

Black, L. W. y Rao, V. B. (2012). Structure, assembly, and DNA packaging of the bacteriophage T4 head. *Adv Virus Res*, 82, 119-153.

Bottcher-Friebertshauser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., Eickmann, M., Uhlendorff, J., Steinmetzer, T., Klenk, H. D. y Garten, W. (2010). Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J Virol*, 84(11), 5605-5614.

- Böttcher, B., Kiselev, N. A., Stel'Mashchuk, V. Y., Perevozchikova, N. A., Borisov, A. V. y Crowther, R. A. (1997). Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *J. Virol.*, 71(1), 325-330.
- Brockman, W. W. y Nathans, D. (1974). The isolation of simian virus 40 variants with specifically altered genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(3), 942-946.
- Bronkhorst, A. W. y van Rij, R. P. (2014). The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. *Curr Opin Virol*, 7, 19-28.
- Busnadiego, I., Maestre, A. M., Rodríguez, D. y Rodríguez, J. F. (2012). The infectious bursal disease virus RNA-binding VP3 polypeptide inhibits PKR-mediated apoptosis. *PLoS One*, 7(10), e46768.
- Butcher, S. J., Grimes, J. M., Makeyev, E. V., Bamford, D. H. y Stuart, D. I. (2001). A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. *Nature*, 410(6825), 235-240.
- Calvert, J. G., Nagy, E., Soler, M. y Dobos, P. (1991). Characterization of the VPg-dsRNA linkage of infectious pancreatic necrosis virus. *J Gen Virol*, 72 (Pt 10), 2563-2567.
- Cann, A. J. (2012). *Principles of Molecular Virology*: Elsevier, Amsterdam.
- Cardone, G., Heymann, J. B., Cheng, N., Trus, B. L. y Steven, A. C. (2012). Procapsid assembly, maturation, nuclear exit: dynamic steps in the production of infectious herpesvirions. *Adv Exp Med Biol*, 726, 423-439.
- Cardone, G., Purdy, J. G., Cheng, N., Craven, R. C. y Steven, A. C. (2009). Visualization of a missing link in retrovirus capsid assembly. *Nature*, 457(7230), 694-698.
- Carpenter, J. E., Henderson, E. P. y Grose, C. (2009). Enumeration of an extremely high particle-to-PFU ratio for Varicella-zoster virus. *J Virol*, 83(13), 6917-6921.
- Carrasco, C., Carreira, A., Schaap, I. A., Serena, P. A., Gomez-Herrero, J., Mateu, M. G. y de Pablo, P. J. (2006). DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(37), 13706-13711.
- Carrasco, C., Castellanos, M., de Pablo, P. J. y Mateu, M. G. (2008). Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(11), 4150-4155.
- Casañas, A., Navarro, A., Ferrer-Orta, C., Gonzalez, D., Rodríguez, J. F. y Verdaguer, N. (2008). Structural insights into the multifunctional protein VP3 of birnaviruses. *Structure*, 16(1), 29-37.
- Caspar, D. L. y Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 27, 1-24.
- Castón, J. C., JL. (2013). The basic architecture of viruses. In *Structure and Physics of Viruses* (ed. M. G. Mateu), pp. 718: vol. in press. The Netherlands.

- Castón, J. R., Martínez-Torrecuadrada, J. L., Maraver, A., Lombardo, E., Rodríguez, J. F., Casal, J. I. y Carrascosa, J. L. (2001). C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *J. Virol.*, 75(22), 10815-10828.
- Castón, J. R., Rodríguez, J. F. y Carrascosa, J. L. (2008). Infectious Bursal Disease Virus: A Segmented Double-Stranded RNA Virus With a T = 13 Capsid that Lacks a T = 1 Core. In *Segmented Double-Stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*: Academic Press.
- Cevik, B. (2013). The RNA-dependent RNA polymerase of Citrus tristeza virus forms oligomers. *Virology*, 447(1-2), 121-130.
- Cohen, J., Poinsard, A. y Scherrer, R. (1973). Physico-chemical and morphological features of infectious pancreatic necrosis virus. *J Gen Virol*, 21(3), 485-498.
- Coloma, R., Valpuesta, J. M., Arranz, R., Carrascosa, J. L., Ortín, J. y Martín-Benito, J. (2009). The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog*, 5(6), e1000491.
- Communie, G., Ruigrok, R. W., Jensen, M. R. y Blackledge, M. (2014). Intrinsically disordered proteins implicated in paramyxoviral replication machinery. *Curr Opin Virol*, 5, 72-81.
- Cosgrove, A. S. (1962). An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Diseases*, 6(3), 385-389.
- Coulibaly, F., Chevalier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B. y Rey, F. A. (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 120(6), 761-772.
- Crowther, R. A., Amos, L. A., Finch, J. T., De Rosier, D. J. y Klug, A. (1970). Three dimensional reconstructions of spherical viruses by fourier synthesis from electron micrographs. *Nature*, 226(5244), 421-425.
- Chang, J. R., Poliakov, A., Prevelige, P. E., Mobley, J. A. y Dokland, T. (2008). Incorporation of scaffolding protein gpO in bacteriophages P2 and P4. *Virology*, 370(2), 352-361.
- Chang, S., Sun, D., Liang, H., Wang, J., Li, J., Guo, L., Wang, X., Guan, C., Boruah, B. M., Yuan, L., Feng, F., Yang, M., Wang, L., Wang, Y., Wojdyla, J., Li, L., Wang, J., Wang, M., Cheng, G., Wang, H. W. y Liu, Y. (2015). Cryo-EM structure of influenza virus RNA polymerase complex at 4.3 Å resolution. *Mol Cell*, 57(5), 925-935.
- Chen, D. H., Baker, M. L., Hryc, C. F., DiMaio, F., Jakana, J., Wu, W., Dougherty, M., Haase-Pettingell, C., Schmid, M. F., Jiang, W., Baker, D., King, J. A. y Chiu, W. (2011). Structural basis for scaffolding-mediated assembly and maturation of a dsDNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(4), 1355-1360.
- Chen, Y., Lu, Z., Zhang, L., Gao, L., Wang, N., Gao, X., Wang, Y., Li, K., Gao, Y., Cui, H., Gao, H., Liu, C., Zhang, Y., Qi, X. y Wang, X. (2016). Ribosomal protein L4 interacts with

viral protein VP3 and regulates the replication of infectious bursal disease virus. *Virus Res*, 211, 73-78.

Cheng, L., Zhu, J., Hui, W. H., Zhang, X., Honig, B., Fang, Q. y Zhou, Z. H. (2010). Backbone model of an aquareovirus virion by cryo-electron microscopy and bioinformatics. *J Mol Biol*, 397(3), 852-863.

Chevalier, C., Galloux, M., Pous, J., Henry, C., Denis, J., Da Costa, B., Navaza, J., Lepault, J. y Delmas, B. (2005). Structural peptides of a nonenveloped virus are involved in assembly and membrane translocation. *J Virol*, 79(19), 12253-12263.

Chevalier, C., Lepault, J., Da Costa, B. y Delmas, B. (2004). The last C-terminal residue of VP3, glutamic acid 257, controls capsid assembly of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 78(7), 3296-3303.

Chevalier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. y Delmas, B. (2002). The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.*, 76(5), 2384-2392.

Chinnaswamy, S., Murali, A., Li, P., Fujisaki, K. y Kao, C. C. (2010). Regulation of de novo-initiated RNA synthesis in hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase by intermolecular interactions. *J Virol*, 84(12), 5923-5935.

Chow, M., Basavappa, R. y Hogle, J. M. (1997). The role of conformational transitions in poliovirus pathogenesis. In *Structural biology of viruses*, pp. 157-186 Oxford University Press.

Chung, I. Y. y Paetzel, M. (2011). Expression, purification and crystallization of VP4 protease from Tellina virus 1. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 67(Pt 1), 157-160.

Da Costa, B., Chevalier, C., Henry, C., Huet, J. C., Petit, S., Lepault, J., Boot, H. y Delmas, B. (2002). The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J. Virol.*, 76(5), 2393-2402.

Da Costa, B., Soignier, S., Chevalier, C., Henry, C., Thory, C., Huet, J. C. y Delmas, B. (2003). Blotched snakehead virus is a new aquatic birnavirus that is slightly more related to avibirnavirus than to aquabirnavirus. *J Virol*, 77(1), 719-725.

de la Rosa-Trevín, J. M., Oton, J., Marabini, R., Zaldivar, A., Vargas, J., Carazo, J. M. y Sorzano, C. O. (2013). Xmipp 3.0: an improved software suite for image processing in electron microscopy. *J Struct Biol*, 184(2), 321-328.

Delmas, B., Mundt, E., Vakharia, V. N. y Wu, J. L. (2012). The Double Stranded RNA Viruses. In *Virus Taxonomy. Family Birnaviridae*, pp. 499-507 Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

Dobos, P. (1993). In vitro guanylation of infectious pancreatic necrosis virus polypeptide VP1. *Virology*, 193(1), 403-413.

Dobos, P. (1995). Protein-primed RNA synthesis in vitro by the virion-associated RNA polymerase of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, 208(1), 19-25.

- Dobos, P., Hill, B. J., Hallett, R., Kells, D. T., Becht, H. y Teninges, D. (1979a). Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J Virol*, 32(2), 593-605.
- Dokland, T. (2000). Freedom and restraint: themes in virus capsid assembly. *Structure*, 8(8), R157-162.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W. y Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*, 21(2), 129-228.
- Duda, R. L., Oh, B. y Hendrix, R. W. (2013). Functional Domains of the HK97 Capsid Maturation Protease and the Mechanisms of Protein Encapsidation. *J Mol Biol*, 425(15), 2765-2781.
- Dulbecco, R. y Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8(3), 396-397.
- Duquerroy, S., Da Costa, B., Henry, C., Vigouroux, A., Libersou, S., Lepault, J., Navaza, J., Delmas, B. y Rey, F. A. (2009). The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. *EMBO J*, 28(11), 1655-1665.
- Egelman, E. H. (2000). A robust algorithm for the reconstruction of helical filaments using single-particle methods. *Ultramicroscopy*, 85(4), 225-234.
- Egelman, E. H. (2010). Reconstruction of helical filaments and tubes. *Methods Enzymol*, 482, 167-183.
- Ekici, O. D., Paetzel, M. y Dalbey, R. E. (2008). Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci*, 17(12), 2023-2037.
- El Omari, K., Sutton, G., Ravantti, J. J., Zhang, H., Walter, T. S., Grimes, J. M., Bamford, D. H., Stuart, D. I. y Mancini, E. J. (2013). Plate tectonics of virus shell assembly and reorganization in phage phi8, a distant relative of mammalian reoviruses. *Structure*, 21(8), 1384-1395.
- Escaffre, O., Le Nouen, C., Amelot, M., Ambroggio, X., Ogden, K. M., Guionie, O., Toquin, D., Muller, H., Islam, M. R. y Eterradossi, N. (2013). Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus. *J Virol*, 87(5), 2767-2780.
- Essere, B., Yver, M., Gavazzi, C., Terrier, O., Isel, C., Fournier, E., Giroux, F., Textoris, J., Julien, T., Socratous, C., Rosa-Calatrava, M., Lina, B., Marquet, R. y Moules, V. (2013). Critical role of segment-specific packaging signals in genetic reassortment of influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(40), E3840-3848.
- Fajardo, T., Jr., Sung, P. Y. y Roy, P. (2015). Disruption of Specific RNA-RNA Interactions in a Double-Stranded RNA Virus Inhibits Genome Packaging and Virus Infectivity. *PLoS Pathog*, 11(12), e1005321.

- Fane, B. A. y Prevelige, P. E. (2003). Mechanism of scaffolding-assisted viral assembly. *Adv. Protein Chem.*, 64, 259-299.
- Fanning, E. y Zhao, K. (2009). SV40 DNA replication: from the A gene to a nanomachine. *Virology*, 384(2), 352-359.
- Fauquet, C. M. y Fargette, D. (2005). International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virol J*, 2, 64.
- Feldman, A. R., Lee, J., Delmas, B. y Paetzel, M. (2006). Crystal structure of a novel viral protease with a serine/lysine catalytic dyad mechanism. *J. Mol. Biol.*, 358(5), 1378-1389.
- Fernández-Arias, A., Risco, C., Martínez, S., Albar, J. P. y Rodríguez, J. F. (1998). Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J Gen Virol*, 79 (Pt 5), 1047-1054.
- Ferrer-Orta, C., Ferrero, D. y Verdaguer, N. (2015). RNA-Dependent RNA Polymerases of Picornaviruses: From the Structure to Regulatory Mechanisms. *Viruses*, 7(8), 4438-4460.
- Ferrero, D., Garriga, D., Navarro, A., Rodríguez, J. F. y Verdaguer, N. (2015a). Infectious Bursal Disease Virus VP3 Upregulates VP1-Mediated RNA-Dependent RNA Replication. *J Virol*, 89(21), 11165-11168.
- Ferrero, D. S., Buxaderas, M., Rodríguez, J. F. y Verdaguer, N. (2015b). The Structure of the RNA-Dependent RNA Polymerase of a Permutotetravirus Suggests a Link between Primer-Dependent and Primer-Independent Polymerases. *PLoS Pathog*, 11(12), e1005265.
- Ferron, F., Li, Z., Danek, E. I., Luo, D., Wong, Y., Coutard, B., Lantéz, V., Charrel, R., Canard, B., Walz, T. y Lescar, J. (2011). The hexamer structure of Rift Valley fever virus nucleoprotein suggests a mechanism for its assembly into ribonucleoprotein complexes. *PLoS Pathog*, 7(5), e1002030.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Rancaniello, V. R. y Skalka, A. M. (2009). *Principles of Virology*, Third edition. Washington, DC: ASM Press.
- Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J. C., Sirbat, J. D., Isel, C., Cavalier, A., Rolland, J. P., Thomas, D., Lina, B. y Marquet, R. (2012). A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic Acids Res*, 40(5), 2197-2209.
- Frangakis, A. S. y Hegerl, R. (2001). Noise reduction in electron tomographic reconstructions using nonlinear anisotropic diffusion. *J Struct Biol*, 135(3), 239-250.
- Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M. y Leith, A. (1996). SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol*, 116(1), 190-199.
- Fuller, S. D., Butcher, S. J., Cheng, R. H. y Baker, T. S. (1996). Three-dimensional reconstruction of icosahedral particles--the uncommon line. *J Struct Biol*, 116(1), 48-55.

- Gallagher, T. M. y Rueckert, R. R. (1988). Assembly-dependent maturation cleavage in provirions of a small icosahedral insect ribovirus. *J. Virol.*, 62(9), 3399-3406.
- Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J. y Delmas, B. (2007). Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *J Biol Chem*, 282(28), 20774-20784.
- Garriga, D., Navarro, A., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Rodríguez, J. F. y Verdaguer, N. (2007). Activation mechanism of a noncanonical RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(51), 20540-20545.
- Garriga, D., Querol-Audi, J., Abaitua, F., Saugar, I., Pous, J., Verdaguer, N., Castón, J. R. y Rodríguez, J. F. (2006). The 2.6-Angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *J Virol*, 80(14), 6895-6905.
- Gertsman, I., Gan, L., Guttman, M., Lee, K., Speir, J. A., Duda, R. L., Hendrix, R. W., Komives, E. A. y Johnson, J. E. (2009). An unexpected twist in viral capsid maturation. *Nature*, 458(7238), 646-650.
- Gilbert, P. F. (1972). The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. II. Direct methods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 182(1066), 89-102.
- Gorbalenya, A. E., Pringle, F. M., Zeddari, J. L., Luke, B. T., Cameron, C. E., Kalkmakoff, J., Hanzlik, T. N., Gordon, K. H. y Ward, V. K. (2002). The palm subdomain-based active site is internally permuted in viral RNA-dependent RNA polymerases of an ancient lineage. *J Mol Biol*, 324(1), 47-62.
- Graham, S. C., Sarin, L. P., Bahar, M. W., Myers, R. A., Stuart, D. I., Bamford, D. H. y Grimes, J. M. (2011). The N-terminus of the RNA polymerase from infectious pancreatic necrosis virus is the determinant of genome attachment. *PLoS Pathog*, 7(6), e1002085.
- Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T. C., Beyer, J., Kollner, B. y Mundt, E. (1997). A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4. *J Virol*, 71(11), 8879-8885.
- Grimes, J. M., Burroughs, J. N., Gouet, P., Diprose, J. M., Malby, R., Zientara, S., Mertens, P. P. y Stuart, D. I. (1998). The atomic structure of the Bluetongue virus core. *Nature*, 395(6701), 470-478.
- Guu, T. S., Dong, L., Wittung-Stafshede, P. y Tao, Y. J. (2008). Mapping the domain structure of the influenza A virus polymerase acidic protein (PA) and its interaction with the basic protein 1 (PB1) subunit. *Virology*, 379(1), 135-142.
- Habchi, J., Mamelli, L., Darbon, H. y Longhi, S. (2010). Structural disorder within Henipavirus nucleoprotein and phosphoprotein: from predictions to experimental assessment. *PLoS One*, 5(7), e11684.

Harrison, S. C. (2007). Principles of virus structure. In *Fields Virology*, vol. 1 eds. P. M. Knipe, D. E. G. Howley, R.A. , M. A. Lamb, B. Martín y S. E. Roizman), pp. 59–98. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Hendrix, R. W. y Johnson, J. E. (2012). Bacteriophage HK97 capsid assembly and maturation. *Adv Exp Med Biol*, 726, 351-363.

Hernando-Pérez, M., Miranda, R., Aznar, M., Carrascosa, J. L., Schaap, I. A., Reguera, D. y de Pablo, P. J. (2012). Direct measurement of phage phi29 stiffness provides evidence of internal pressure. *Small*, 8(15), 2366-2370.

Hernando-Pérez, M., Pascual, E., Aznar, M., Ionel, A., Castón, J. R., Luque, A., Carrascosa, J. L., Reguera, D. y de Pablo, P. J. (2014). The interplay between mechanics and stability of viral cages. *Nanoscale*, 6(5), 2702-2709.

Heymann, J. B. y Belnap, D. M. (2007). Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J Struct Biol*, 157(1), 3-18.

Hjalmarsson, A., Carlemalm, E. y Everitt, E. (1999). Infectious pancreatic necrosis virus: identification of a VP3-containing ribonucleoprotein core structure and evidence for O-linked glycosylation of the capsid protein VP2. *J Virol*, 73(4), 3484-3490.

Hogbom, M., Jager, K., Robel, I., Unge, T. y Rohayem, J. (2009). The active form of the norovirus RNA-dependent RNA polymerase is a homodimer with cooperative activity. *J Gen Virol*, 90(Pt 2), 281-291.

Honda, A., Ueda, K., Nagata, K. y Ishihama, A. (1988). RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem*, 104(6), 1021-1026.

Horcas, I., Fernández, R., Gomez-Rodríguez, J. M., Colchero, J., Gomez-Herrero, J. y Baro, A. M. (2007). WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum*, 78(1), 013705.

Huiskonen, J. T., de Haas, F., Bubeck, D., Bamford, D. H., Fuller, S. D. y Butcher, S. J. (2006). Structure of the bacteriophage phi6 nucleocapsid suggests a mechanism for sequential RNA packaging. *Structure*, 14(6), 1039-1048.

Irigoyen, N., Castón, J. R. y Rodríguez, J. F. (2012). Host proteolytic activity is necessary for infectious bursal disease virus capsid protein assembly. *J Biol Chem*, 287(29), 24473-24482.

Irigoyen, N., Garriga, D., Navarro, A., Verdaguer, N., Rodríguez, J. F. y Castón, J. R. (2009). Autoproteolytic activity derived from the infectious bursal disease virus capsid protein. *J Biol Chem*, 284(12), 8064- 8072.

Jaalinoja, H. T., Huiskonen, J. T. y Butcher, S. J. (2007). Electron cryomicroscopy comparison of the architectures of the enveloped bacteriophages phi6 and phi8. *Structure*, 15(2), 157-167.

Jeffery, C. J. (1999). Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci*, 24(1), 8-11.

- Jiang, W., Li, Z., Zhang, Z., Baker, M. L., Prevelige, P. E., Jr. y Chiu, W. (2003). Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. *Nat Struct Biol*, 10(2), 131-135.
- Johnson, J. E. (1996). Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1), 27-33.
- Johnson, J. E. (2008). Multi-disciplinary studies of viruses: the role of structure in shaping the questions and answers. *J Struct Biol*, 163(3), 246-253.
- Johnson, J. E. y Chiu, W. (2007). DNA packaging and delivery machines in tailed bacteriophages. *Curr Opin Struct Biol*, 17(2), 237-243.
- Johnson, J. E. y Rueckert, R. R. (1997). Packaging and release of the viral genome. In *Structural Biology of Viruses* eds. R. M. Chiu and R. L. Burnett, pp. 269–287: University Press Oxford.
- Kaufer, I. y Weiss, E. (1980). Significance of bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens. *Infect Immun*, 27(2), 364-367.
- Kibenge, F. S., Dhillon, A. S. y Russell, R. G. (1988). Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J Gen Virol*, 69 (Pt 8), 1757-1775.
- Kremer, J. R., Mastronarde, D. N. y McIntosh, J. R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*, 116(1), 71-76.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lago, M., Rodríguez, J. F., Bandin, I. y Dopazo, C. P. (2016). Aquabirnavirus polyploidy: A new strategy to modulate virulence? *J Gen Virol*.
- Lee, C. C., Ko, T. P., Chou, C. C., Yoshimura, M., Doong, S. R., Wang, M. Y. y Wang, A. H. (2006). Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6Å resolution: Implications in virion assembly and immunogenicity. *J. Struct. Biol.*, 155(1), 74-86.
- Lee, J., Feldman, A. R., Delmas, B. y Paetzel, M. (2007). Crystal structure of the VP4 protease from infectious pancreatic necrosis virus reveals the acyl-enzyme complex for an intermolecular self-cleavage reaction. *J Biol Chem*, 282(34), 24928-24937.
- Leidig, C., Bange, G., Kopp, J., Amlacher, S., Aravind, A., Wickles, S., Witte, G., Hurt, E., Beckmann, R. y Sinning, I. (2013). Structural characterization of a eukaryotic chaperone--the ribosome-associated complex. *Nat Struct Mol Biol*, 20(1), 23-28.
- Lejal, N., Da Costa, B., Huet, J. C. y Delmas, B. (2000). Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites. *J Gen Virol*, 81(Pt 4), 983-992.

- Li, Z., Wang, Y., Xue, Y., Li, X., Cao, H. y Zheng, S. J. (2012). Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in infectious bursal disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *J Virol*, 86(3), 1328-1338.
- Liu, M. y Vakharia, V. N. (2006). Nonstructural protein of infectious bursal disease virus inhibits apoptosis at the early stage of virus infection. *J Virol*, 80(7), 3369-3377.
- Lombardo, E., Maraver, A., Castán, J. R., Rivera, J., Fernández-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J. L. y Rodríguez, J. F. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol*, 73(8), 6973-6983.
- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernández-Arias, A. y Rodríguez, J. F. (2000). VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*, 277(2), 345-357.
- Lu, G., Zhou, Z. H., Baker, M. L., Jakana, J., Cai, D., Wei, X., Chen, S., Gu, X. y Chiu, W. (1998). Structure of double-shelled rice dwarf virus. *J Virol*, 72(11), 8541-8549.
- Ludtke, S. J., Baldwin, P. R. y Chiu, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol*, 128(1), 82-97.
- Luque, D., Gomez-Blanco, J., Garriga, D., Brilot, A. F., Gonzalez, J. M., Havens, W. M., Carrascosa, J. L., Trus, B. L., Verdaguer, N., Ghabrial, S. A. y Castón, J. R. (2014). Cryo-EM near-atomic structure of a dsRNA fungal virus shows ancient structural motifs preserved in the dsRNA viral lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(21), 7641-7646.
- Luque, D., Gonzalez, J. M., Garriga, D., Ghabrial, S. A., Havens, W. M., Trus, B., Verdaguer, N., Carrascosa, J. L. y Castón, J. R. (2010). The T=1 capsid protein of *Penicillium chrysogenum* virus is formed by a repeated helix-rich core indicative of gene duplication. *J Virol*, 84(14), 7256-7266.
- Luque, D., Rivas, G., Alfonso, C., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. y Castón, J. R. (2009a). Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(7), 2148-2152.
- Luque, D., Saugar, I., Rejas, M. T., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. y Castón, J. R. (2009b). Infectious Bursal disease virus: ribonucleoprotein complexes of a double-stranded RNA virus. *J Mol Biol*, 386(3), 891-901.
- Luque, D., Saugar, I., Rodríguez, J. F., Verdaguer, N., Garriga, D., Martín, C. S., Velazquez-Muriel, J. A., Trus, B. L., Carrascosa, J. L. y Castón, J. R. (2007). Infectious bursal disease virus capsid assembly and maturation by structural rearrangements of a transient molecular switch. *J Virol*, 81(13), 6869-6878.
- Mangel, W. F. y San Martín, C. (2014). Structure, function and dynamics in adenovirus maturation. *Viruses*, 6(11), 4536-4570.

Mani, M., Chen, C., Ambler, V., Liu, H., Mathur, T., Zwicke, G., Zabad, S., Patel, B., Thakkar, J. y Jeffery, C. J. (2015). MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight. *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue), D277-282.

Maraver, A., Clemente, R., Rodríguez, J. F. y Lombardo, E. (2003a). Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. *J. Virol.*, 77(4), 2459-2468.

Maraver, A., Oña, A., Abaitua, F., Gonzalez, D., Clemente, R., Ruiz-Diaz, J. A., Castón, J. R., Pazos, F. y Rodríguez, J. F. (2003b). The oligomerization domain of VP3, the scaffolding protein of infectious bursal disease virus, plays a critical role in capsid assembly. *J Virol*, 77(11), 6438-6449.

Martínez-Torrecuadrada, J. L., Castón, J. R., Castro, M., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. y Casal, J. I. (2000). Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology*, 278(2), 322-331.

Mastronarde, D. N. (2005). Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J Struct Biol*, 152(1), 36-51.

Mateo, R. (2004). Disección funcional de las interfases entre subunidades de la cápsida del virus de la fiebre aftosa y aproximaciones al diseño de cápsidas más estables., Universidad Autónoma de Madrid.

Mateu, M. G. (2013). Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Arch Biochem Biophys*, 531(1-2), 65-79.

McClain, B., Settembre, E., Temple, B. R., Bellamy, A. R. y Harrison, S. C. (2010). X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 397(2), 587-599.

Méndez, F., de Garay, T., Rodríguez, D. y Rodríguez, J. F. (2015). Infectious bursal disease virus VP5 polypeptide: a phosphoinositide-binding protein required for efficient cell-to-cell virus dissemination. *PLoS One*, 10(4), e0123470.

Min, K. W., Lee, S. H. y Baek, S. J. (2016). Moonlighting proteins in cancer. *Cancer Lett*, 370(1), 108-116.

Mindell, J. A. y Grigorieff, N. (2003). Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J Struct Biol*, 142(3), 334-347.

Morais, M. C., Fisher, M., Kanamaru, S., Przybyla, L., Burgner, J., Fane, B. A. y Rossmann, M. G. (2004). Conformational switching by the scaffolding protein D directs the assembly of bacteriophage phiX174. *Mol Cell*, 15(6), 991-997.

Morais, M. C., Kanamaru, S., Badasso, M. O., Koti, J. S., Owen, B. A., McMurray, C. T., Anderson, D. L. y Rossmann, M. G. (2003). Bacteriophage phi29 scaffolding protein gp7 before and after prohead assembly. *Nat Struct Biol*, 10(7), 572-576.

- Morgan, M. M., Macreadie, I. G., Harley, V. R., Hudson, P. J. y Azad, A. A. (1988). Sequence of the small double-stranded RNA genomic segment of infectious bursal disease virus and its deduced 90-kDa product. *Virology*, 163(1), 240-242.
- Morin, I. y Schaeffer, P. M. (2012). Combining RNA-DNA swapping and quantitative polymerase chain reaction for the detection of influenza A nucleoprotein. *Anal Biochem*, 420(2), 121-126.
- Muller, H., Islam, M. R. y Raue, R. (2003). Research on infectious bursal disease--the past, the present and the future. *Vet Microbiol*, 97(1-2), 153-165.
- Muller, H. y Nitschke, R. (1987). The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology*, 159(1), 174-177.
- Muller, H., Scholtissek, C. y Becht, H. (1979). The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *J Virol*, 31(3), 584-589.
- Mundt, E., Kollner, B. y Kretzschmar, D. (1997). VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol*, 71(7), 5647-5651.
- Munshi, S., Liljas, L., Cavarelli, J., Bomu, W., McKinney, B., Reddy, V. y Johnson, J. E. (1996). The 2.8 Å structure of a T = 4 animal virus and its implications for membrane translocation of RNA. *J Mol Biol*, 261(1), 1-10.
- Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R. B. y Johnson, J. E. (2002). L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism. *Nat. Struct. Biol.*, 9(10), 725-728.
- Nakagawa, A., Miyazaki, N., Taka, J., Naitow, H., Ogawa, A., Fujimoto, Z., Mizuno, H., Higashi, T., Watanabe, Y., Omura, T., Cheng, R. H. y Tsukihara, T. (2003). The atomic structure of rice dwarf virus reveals the self-assembly mechanism of component proteins. *Structure*, 11(10), 1227-1238.
- Negash, T., al-Garib, S. O. y Gruys, E. (2004). Comparison of in ovo and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. *Vet Q*, 26(2), 76-87.
- Nemecek, D., Plevka, P. y Boura, E. (2013). Using cryoEM Reconstruction and Phase Extension to Determine Crystal Structure of Bacteriophage varphi6 Major Capsid Protein. *Protein J*, 32(8), 635-640.
- Nibert, M. L. y Schiff, L. A. (2001). Reoviruses and their replication. In Fields. *Virology*, vol. 2 eds. D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martín, R. A. Lamb, B. Roizman y S. E. Strauss), pp. 1679-1728. Philadelphia: Lippincott WilliamsyWilkins.
- Nick, H., Cursiefen, D. y Becht, H. (1976). Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus. *J Virol*, 18(1), 227-234.

Nicoll, W. S., Boshoff, A., Ludewig, M. H., Hennessy, F., Jung, M. y Blatch, G. L. (2006). Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones. *Protein Expr Purif*, 46(1), 1-15.

Oña, A., Luque, D., Abaitua, F., Maraver, A., Castón, J. R. y Rodríguez, J. F. (2004). The C-terminal domain of the pVP2 precursor is essential for the interaction between VP2 and VP3, the capsid polypeptides of infectious bursal disease virus. *Virology*, 322(1), 135-142.

Ortega-Esteban, A., Horcas, I., Hernando-Pérez, M., Ares, P., Pérez-Berná, A. J., San Martín, C., Carrascosa, J. L., de Pablo, P. J. y Gomez-Herrero, J. (2012). Minimizing tip-sample forces in jumping mode atomic force microscopy in liquid. *Ultramicroscopy*, 114, 56-61.

Ortega-Esteban, A., Pérez-Berná, A. J., Menendez-Conejero, R., Flint, S. J., San Martín, C. y de Pablo, P. J. (2013). Monitoring dynamics of human adenovirus disassembly induced by mechanical fatigue. *Sci Rep*, 3, 1434.

Ortín, J. y Martín-Benito, J. (2015). The RNA synthesis machinery of negative-stranded RNA viruses. *Virology*, 479-480, 532-544.

Pan, J., Dong, L., Lin, L., Ochoa, W. F., Sinkovits, R. S., Havens, W. M., Nibert, M. L., Baker, T. S., Ghabrial, S. A. y Tao, Y. J. (2009a). Atomic structure reveals the unique capsid organization of a dsRNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), 4225-4230.

Pan, J., Lin, L. y Tao, Y. J. (2009b). Self-guanylylation of birnavirus VP1 does not require an intact polymerase activity site. *Virology*, 395(1), 87-96.

Pan, J., Vakharia, V. N. y Tao, Y. J. (2007). The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(18), 7385-7390.

Pascual-Montano, A., Donate, L. E., Valle, M., Barcena, M., Pascual-Marqui, R. D. y Carazo, J. M. (2001). A novel neural network technique for analysis and classification of EM single-particle images. *J Struct Biol*, 133(2-3), 233-245.

Pawlita, M., Muller, M., Oppenlander, M., Zentgraf, H. y Herrmann, M. (1996). DNA encapsidation by viruslike particles assembled in insect cells from the major capsid protein VP1 of B-lymphotropic papovavirus. *J Virol*, 70(11), 7517-7526.

Pedersen, T., Skjesol, A. y Jorgensen, J. B. (2007). VP3, a structural protein of infectious pancreatic necrosis virus, interacts with RNA-dependent RNA polymerase VP1 and with double-stranded RNA. *J Virol*, 81(12), 6652-6663.

Pelletier, A., Do, F., Brisebois, J. J., Lagace, L. y Cordingley, M. G. (1997). Self-association of herpes simplex virus type 1 ICP35 is via coiled-coil interactions and promotes stable interaction with the major capsid protein. *J Virol*, 71(7), 5197-5208.

Pérez-Berná, A. J., Marion, S., Chichon, F. J., Fernández, J. J., Winkler, D. C., Carrascosa, J. L., Steven, A. C., Siber, A. y San Martín, C. (2015). Distribution of DNA-condensing protein complexes in the adenovirus core. *Nucleic Acids Res*, 43(8), 4274-4283.

Perlmutter, J. D. y Hagan, M. F. (2015). Mechanisms of virus assembly. *Annu Rev Phys Chem*, 66, 217-239.

Perlmutter, J. D., Qiao, C. y Hagan, M. F. (2013). Viral genome structures are optimal for capsid assembly. *Elife*, 2, e00632.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. y Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25(13), 1605-1612.

Pettersson, R. F. y von Bonsdorff, C. H. (1975). Ribonucleoproteins of Uukuniemi virus are circular. *J Virol*, 15(2), 386-392.

Popa, M. P., McKelvey, T. A., Hempel, J. y Hendrix, R. W. (1991). Bacteriophage HK97 structure: wholesale covalent cross-linking between the major head shell subunits. *J Virol*, 65(6), 3227-3237.

Portela, A. y Digard, P. (2002). The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*, 83(Pt 4), 723-734.

Prasad, B. V. y Prevelige, P. E., Jr. (2003). Viral genome organization. *Adv Protein Chem*, 64, 219-258.

Prasad, B. V. y Schmid, M. F. (2012). Principles of virus structural organization. *Adv Exp Med Biol*, 726, 17-47.

Prevelige, P. E., Jr., Thomas, D. y King, J. (1988). Scaffolding protein regulates the polymerization of P22 coat subunits into icosahedral shells in vitro. *J Mol Biol*, 202(4), 743-757.

Raymond, D. D., Piper, M. E., Gerrard, S. R. y Smith, J. L. (2010). Structure of the Rift Valley fever virus nucleocapsid protein reveals another architecture for RNA encapsidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(26), 11769-11774.

Reinisch, K. M., Nibert, M. L. y Harrison, S. C. (2000). Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature*, 404(6781), 960-967.

Rossmann, M. G., Greeve, J. M., Kolatkar, P. R., Olson, N. H., Smith, T. J., McKinlay, M. A. y Rueckert, R. R. (1997). Rhinovirus attachment and cell entry. In *Structural biology of viruses*, pp. 105-133: Oxford University Press.

Sabanadzovic, S., Ghanem-Sabanadzovic, N. A. y Gorbalenya, A. E. (2009). Permutation of the active site of putative RNA-dependent RNA polymerase in a newly identified species of plant alpha-like virus. *Virology*, 394(1), 1-7.

San Martín, C. (2012). Latest insights on adenovirus structure and assembly. *Viruses*, 4(5), 847-877.

- Sánchez, A. B. y Rodríguez, J. F. (1999). Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*, 262(1), 190-199.
- Sato, H., Emoto, E., Kamata, T., Mori, H., Kamei, K., Kitaoka, A., Takano, R., Nakajima, K., Inui, Y., Kudo, K. y Hara, S. (1999). Cloning and expression of yellowtail ascites virus segment A. *Arch Virol*, 144(7), 1405-1413.
- Saugar, I., Irigoyen, N., Luque, D., Carrascosa, J. L., Rodríguez, J. F. y Castón, J. R. (2010). Electrostatic interactions between capsid and scaffolding proteins mediate the structural polymorphism of a double-stranded RNA virus. *J Biol Chem*, 285(6), 3643-3650.
- Saugar, I., Luque, D., Oña, A., Rodríguez, J. F., Carrascosa, J. L., Trus, B. L. y Castón, J. R. (2005). Structural polymorphism of the major capsid protein of a double-stranded RNA virus: an amphipathic alpha helix as a molecular switch. *Structure*, 13(7), 1007-1017.
- Scheres, S. H. (2012a). A Bayesian view on cryo-EM structure determination. *J Mol Biol*, 415(2), 406-418.
- Scheres, S. H. (2012b). RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J Struct Biol*, 180(3), 519-530.
- Scheres, S. H., Melero, R., Valle, M. y Carazo, J. M. (2009). Averaging of electron subtomograms and random conical tilt reconstructions through likelihood optimization. *Structure*, 17(12), 1563-1572.
- Scheres, S. H., Nunez-Ramirez, R., Sorzano, C. O., Carazo, J. M. y Marabini, R. (2008). Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. *Nat Protoc*, 3(6), 977-990.
- Scheres, S. H., Valle, M. y Carazo, J. M. (2005). Fast maximum-likelihood refinement of electron microscopy images. *Bioinformatics*, 21 Suppl 2, ii243-244.
- Schmidt, U. y Darke, P. L. (1997). Dimerization and activation of the herpes simplex virus type 1 protease. *J Biol Chem*, 272(12), 7732-7735.
- Schneemann, A. (2006). The structural and functional role of RNA in icosahedral virus assembly. *Annu Rev Microbiol*, 60, 51-67.
- Schneemann, A., Reddy, V. y Johnson, J. E. (1998). The structure and function of nodavirus particles: a paradigm for understanding chemical biology. *Adv. Virus Res.*, 50, 381-446.
- Schneemann, A., Zhong, W., Gallagher, T. M. y Rueckert, R. R. (1992). Maturation cleavage required for infectivity of a nodavirus. *J Virol*, 66(11), 6728-6734.
- Schoehn, G., Mavrikis, M., Albertini, A., Wade, R., Hoenger, A. y Ruigrok, R. W. (2004). The 12 A structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J Mol Biol*, 339(2), 301-312.

Settembre, E. C., Chen, J. Z., Dormitzer, P. R., Grigorieff, N. y Harrison, S. C. (2011). Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J*, 30(2), 408-416.

Shwed, P. S., Dobos, P., Cameron, L. A., Vakharia, V. N. y Duncan, R. (2002). Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif. *Virology*, 296(2), 241-250.

Snijder, J., Uetrecht, C., Rose, R. J., Sánchez-Eugenia, R., Marti, G. A., Agirre, J., Guerin, D. M., Wuite, G. J., Heck, A. J. y Roos, W. H. (2013). Probing the biophysical interplay between a viral genome and its capsid. *Nat Chem*, 5(6), 502-509.

Sorzano, C. O., Bilbao-Castro, J. R., Shkolnisky, Y., Alcorlo, M., Melero, R., Caffarena-Fernández, G., Li, M., Xu, G., Marabini, R. y Carazo, J. M. (2010). A clustering approach to multireference alignment of single-particle projections in electron microscopy. *J Struct Biol*, 171(2), 197-206.

Spagnolo, J. F., Rossignol, E., Bullitt, E. y Kirkegaard, K. (2010). Enzymatic and nonenzymatic functions of viral RNA-dependent RNA polymerases within oligomeric arrays. *Rna*, 16(2), 382-393.

Speir, J. A. y Johnson, J. E. (2012). Nucleic acid packaging in viruses. *Curr Opin Struct Biol*, 22(1), 65-71.

Spies, U. y Muller, H. (1990). Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group. *J Gen Virol*, 71 (Pt 4), 977-981.

Spies, U., Muller, H. y Becht, H. (1987). Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Res*, 8(2), 127-140.

Steven, A. C., Heymann, J. B., Cheng, N., Trus, B. L. y Conway, J. F. (2005). Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol*, 15(2), 227-236.

Sun, S., Rao, V. B. y Rossmann, M. G. (2010). Genome packaging in viruses. *Curr Opin Struct Biol*, 20(1), 114-120.

Sung, P. Y. y Roy, P. (2014). Sequential packaging of RNA genomic segments during the assembly of Bluetongue virus. *Nucleic Acids Res*, 42(22), 13824-13838.

Tacken, M. G., Peeters, B. P., Thomas, A. A., Rottier, P. J. y Boot, H. J. (2002). Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *J Virol*, 76(22), 11301-11311.

Tacken, M. G., Rottier, P. J., Gielkens, A. L. y Peeters, B. P. (2000). Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol*, 81(Pt 1), 209-218.

- Tang, G., Peng, L., Baldwin, P. R., Mann, D. S., Jiang, W., Rees, I. y Ludtke, S. J. (2007). EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol*, 157(1), 38-46.
- Tao, Y., Farsetta, D. L., Nibert, M. L. y Harrison, S. C. (2002). RNA Synthesis in a Cage-Structural Studies of Reovirus Polymerase λ 3. *Cell*, 111(5), 733-745.
- Tawar, R. G., Duquerroy, S., Vonnrhein, C., Varela, P. F., Damier-Piolle, L., Castagne, N., MacLellan, K., Bedouelle, H., Bricogne, G., Bhella, D., Eleouet, J. F. y Rey, F. A. (2009). Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science*, 326(5957), 1279-1283.
- Tompa, P., Szasz, C. y Buday, L. (2005). Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci*, 30(9), 484-489.
- Tuthill, T. J., Groppelli, E., Hogle, J. M. y Rowlands, D. J. (2010). Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 343, 43-89.
- Uchiyama, A., Heiman, P. y Fane, B. A. (2009). N-terminal deletions of the phiX174 external scaffolding protein affect the timing and fidelity of assembly. *Virology*, 386(2), 303-309.
- Underwood, B. O., Smale, C. J., Brown, F. y Hill, B. J. (1977). Relationship of a virus from *Tellina tenuis* to infectious pancreatic necrosis virus. *J Gen Virol*, 36(1), 93-109.
- Valli, A., Busnadiego, I., Maliogka, V., Ferrero, D., Castón, J. R., Rodríguez, J. F. y García, J. A. (2012). The VP3 factor from viruses of Birnaviridae family suppresses RNA silencing by binding both long and small RNA duplexes. *PLoS One*, 7(9), e45957.
- van Cleef, K. W., van Mierlo, J. T., Miesen, P., Overheul, G. J., Fros, J. J., Schuster, S., Marklewitz, M., Pijlman, G. P., Junglen, S. y van Rij, R. P. (2014). Mosquito and *Drosophila* entomobirnaviruses suppress dsRNA- and siRNA-induced RNAi. *Nucleic Acids Res*, 42(13), 8732-8744.
- van der Schaar, H. M., Rust, M. J., Waarts, B. L., van der Ende-Metselaar, H., Kuhn, R. J., Wilschut, J., Zhuang, X. y Smit, J. M. (2007). Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol*, 81(21), 12019-12028.
- van Heel, M. (1984). Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy*, 13(1-2), 165-183.
- Vancini, R., Paredes, A., Ribeiro, M., Blackburn, K., Ferreira, D., Kononchik, J. P., Jr., Hernandez, R. y Brown, D. (2012). Espirito Santo virus: a new birnavirus that replicates in insect cells. *J Virol*, 86(5), 2390-2399.
- Veesler, D. y Johnson, J. E. (2012). Virus maturation. *Annu Rev Biophys*, 41, 473-496.
- Villanueva, R. A., Galaz, J. L., Valdes, J. A., Jashes, M. M. y Sandino, A. M. (2004). Genome assembly and particle maturation of the birnavirus infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.*, 78(24), 13829-13838.

Wei, L., Hou, L., Zhu, S., Wang, J., Zhou, J. y Liu, J. (2011). Infectious bursal disease virus activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway by interaction of VP5 protein with the p85alpha subunit of PI3K. *Virology*, 417(1), 211-220.

Wu, Y., Hong, L., Ye, J., Huang, Z. y Zhou, J. (2009). The VP5 protein of infectious bursal disease virus promotes virion release from infected cells and is not involved in cell death. *Arch Virol*, 154(12), 1873-1882.

Xu, H. T., Si, W. D. y Dobos, P. (2004). Mapping the site of guanylation on VP1, the protein primer for infectious pancreatic necrosis virus RNA synthesis. *Virology*, 322(1), 199-210.

Ye, C., Jia, L., Sun, Y., Hu, B., Wang, L., Lu, X. y Zhou, J. (2014). Inhibition of antiviral innate immunity by birnavirus VP3 protein via blockage of viral double-stranded RNA binding to the host cytoplasmic RNA detector MDA5. *J Virol*, 88(19), 11154-11165.

Yoffe, A. M., Prinsen, P., Gopal, A., Knobler, C. M., Gelbart, W. M. y Ben-Shaul, A. (2008). Predicting the sizes of large RNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(42), 16153-16158.

Yu, X., Jin, L. y Zhou, Z. H. (2008). 3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy. *Nature*, 453(7193), 415-419.

Zandi, R. y van der Schoot, P. (2009). Size regulation of ss-RNA viruses. *Biophys J*, 96(1), 9-20.

Zeddami, J. L., Gordon, K. H., Lauber, C., Alves, C. A., Luke, B. T., Hanzlik, T. N., Ward, V. K. y Gorbalenya, A. E. (2010). Euprosteria elaeasa virus genome sequence and evolution of the Tetraviridae family: emergence of bipartite genomes and conservation of the VPg signal with the dsRNA Birnaviridae family. *Virology*, 397(1), 145-154.

Zhang, X., Boyce, M., Bhattacharya, B., Schein, S., Roy, P. y Zhou, Z. H. (2010). Bluetongue virus coat protein VP2 contains sialic acid-binding domains, and VP5 resembles enveloped virus fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(14), 6292-6297.

Zhang, X., Ji, Y., Zhang, L., Harrison, S. C., Marinescu, D. C., Nibert, M. L. y Baker, T. S. (2005). Features of reovirus outer capsid protein mu1 revealed by electron cryomicroscopy and image reconstruction of the virion at 7.0 Å resolution. *Structure*, 13(10), 1545-1557.

Zlotnick, A., Lee, A., Bourne, C. R., Johnson, J. M., Domanico, P. L. y Stray, S. J. (2007). In vitro screening for molecules that affect virus capsid assembly (and other protein association reactions). *Nat Protoc*, 2(3), 490-498.

Zlotnick, A., Porterfield, J. Z. y Wang, J. C. (2013). To build a virus on a nucleic acid substrate. *Biophys J*, 104(7), 1595-1604.

Zlotnick, A., Reddy, V. S., Dasgupta, R., Schneemann, A., Ray, W. J., Jr., Rueckert, R. R. y Johnson, J. E. (1994). Capsid assembly in a family of animal viruses primes an autoproteolytic maturation that depends on a single aspartic acid residue. *J. Biol. Chem.*, 269(18), 13680-13684.